

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



Marie Martinisková

Kontrastní látky pro ^{19}F nukleární magnetickou tomografii

Contrast agents for ^{19}F magnetic resonance imaging

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2015

Vincit qui patitur.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 26. 8. 2015

Marie Martinisková

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu a studium nových makrocyclických ligandů obsahujících atomy fluoru s potenciálním použitím jako kontrastních látek pro ^{19}F tomografii magnetické rezonance.

Připravené ligandy jsou navrženy jako analoga v klinické praxi již používaných ligandů – ligand odvozený od struktury cyklenu pro komplexaci trojmocných iontů lanthanoidů a série ligandů odvozených od struktury cyklamu pro komplexaci nikelnatých iontů.

Byly připraveny a charakterizovány všechny navržené ligandy.

Byly studovány relaxační parametry *in vitro* a *in vivo* připravených Ln^{3+} komplexů ligandu DOTP^{tfe}.

Abstract

The aim of this Master Thesis is to synthesize and study new macrocyclic ligands containing fluorine atoms for use as potential contrast agents in ^{19}F magnetic resonance imaging.

New ligands were designed as analogues of ligands used in contrast agents already utilized in clinical practice – macrocyclic ligand for complexation of trivalent lanthanide ions based on DOTA skeleton and series of macrocyclic ligands for complexation of divalent nickel ion based on cyclam skeleton.

All designed ligands were synthesized and characterized.

The complexes $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ were tested *in vitro* and *in vivo* to study ^{19}F NMR relaxation times enhancements.

Poděkování

Tento příběh není smyšlený, skutečně se stal, a jakákoliv podobnost se skutečnými postavami či událostmi není čistě náhodná. Jde o holou skutečnost.

A proto bych ráda poděkovala lidem, kteří se na tomto příběhu podíleli.

Svému školiteli, doc. Janu Kotkovi, za jeho trpělivost a cenné rady.

Petru Hermannovi a Vojtovi Kubíčkovi za poskytnuté konzultace.

RnDr. Ivaně Císařové za změření a vyřešení krystalových struktur.

Vítovi Herynkovi a Danu Jirákovvi za MRI experimenty provedené na vytouženém ligandu.

Celé naší skupině za motivující pracovní prostředí, krásné chvíle prokrastinace a pozitivní přístup k životu, jmenovitě hlavně Terce Krchové, Honzovi Blahutovi, Peteru Urbanovskému a Monče Paúrové. V neposledně řadě také Sandrovi, Ondru Zemkovi a dalším, kteří mě provázeli na této cestě.

Svému muži, Honzovi Havlíkovi, za podporu, pomoc a dostatečný přísun kávy během tvoření této práce.

Své rodině – za to, že mě naučila čelit nástrahám všedním i nevšedním.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. Teoretická část | 9 |
| 1.1 ZOBRAZOVACÍ METODY V MEDICÍNĚ..... | 9 |
| 1.2 TOMOGRAFIE MAGNETICKÉ REZONANCE (MRI)..... | 10 |
| 1.3 JÁDRO ^{19}F A MRI | 11 |
| 1.3.1 Kontrastní látky pro ^{19}F MRI | 13 |
| 1.4 TERMODYNAMICKÁ STABILITA A KINETICKÁ INERTNOST KOMPLEXŮ | 19 |
| 2. Cíle práce..... | 22 |
| 3. Experimentální část..... | 23 |
| 3.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ..... | 23 |
| 3.2 METODY CHARAKTERIZACE | 23 |
| 3.2.1 NMR spektroskopie | 23 |
| 3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS) | 24 |
| 3.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC) | 24 |
| 3.2.4 Elementární analýza | 25 |
| 3.2.5 Rentgenostrukturní analýza..... | 25 |
| 3.2.6 Relaxační studie | 25 |
| 3.3 SYNTETICKÁ ČÁST | 26 |
| 3.3.1 Příprava 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny | 26 |
| 3.3.2 Příprava ethylesteru 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny | 27 |
| 3.3.3 Příprava <i>N</i> -benzyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu | 28 |
| 3.3.4 Příprava <i>N</i> -benzyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7- tris[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny] ($\text{DO3P}^{\text{tfe}}\text{Bn}$) | 31 |
| 3.3.5 Příprava 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7- tris[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny] (DO3P^{tfe})..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.6 Příprava 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny] (DOTP ^{tf_e})..... | 34 |
| 3.3.7 Příprava 1,8-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]cyklamu | 36 |
| 3.3.8 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfinové) kyseliny | 38 |
| 3.3.9 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis[methyl(hydroxomethyl)fosfinové] kyseliny | 40 |
| 3.3.10 Příprava tetraethylesteru 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny | 41 |
| 3.3.11 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny | 43 |
| 3.3.12 Příprava komplexů [Ln(DOTP ^{tf_e})] ⁻ | 45 |
| 4. Výsledky a diskuze | 50 |
| 4.1 PŘÍPRAVA 2,2,2-TRIFLUORETHYLFOSFINOVÉ KYSELINY A JEJÍHO ETHYLESTERU | 50 |
| 4.2 PŘÍPRAVA DO3P ^{TFE} BN A DOTP ^{TFE} | 51 |
| 4.3 PŘÍPRAVA DO3P ^{TFE} | 58 |
| 4.4 PŘÍPRAVA 1,8-BIS[BIS(3,5-TRIFLUORMETHYL)BENZYL]CYKLAMU..... | 59 |
| 4.5 PŘÍPRAVA 1,4,8,11-TETRAAZACYKLOTETRADEKAN-4,11-BIS[BIS(3,5-TRIFLUORMETHYL)BENZYL]-1,8-BIS(METHYLFOSFINOVÉ) KYSELINY | 60 |
| 4.6 PŘÍPRAVA 1,4,8,11-TETRAAZACYKLOTETRADEKAN-4,11-BIS[BIS(3,5-TRIFLUORMETHYL)BENZYL]-1,8-BIS[METHYL(HYDROXOMETHYL)FOSFINOVÉ] KYSELINY..... | 60 |
| 4.7 PŘÍPRAVA TETRAETHYLESTERU 1,4,8,11-TETRAAZACYKLOTETRADEKAN-4,11-BIS[BIS(3,5-TRIFLUORMETHYL)BENZYL]-1,8-BIS(METHYLFOSFONOVÉ) KYSELINY ... | 61 |
| 4.8 PŘÍPRAVA 1,4,8,11-TETRAAZACYKLOTETRADEKAN-4,11-BIS[BIS(3,5-TRIFLUORMETHYL)BENZYL]-1,8-BIS(METHYLFOSFONOVÉ) KYSELINY | 62 |
| 4.9 NMR TITRACE DOTP ^{TFE} | 64 |
| 4.10 RELAXOMETRICKÉ STUDIE KOMPLEXŮ [Ln ^{III} (DOTP ^{TFE})] ⁻ | 66 |

| | |
|--|-----------|
| 5. Závěr | 71 |
| 6. Seznam literatury | 72 |
| 7. Seznam použitých zkratek | 77 |

1. Teoretická část

1.1 Zobrazovací metody v medicíně

Molekulární a buněčné zobrazování je definováno jako neinvazivní a opakované zobrazování značených molekul a biologických procesů v živých organizmech.[1]

Optimální molekulární a buněčné zobrazovací techniky poskytují informace o stavu a vývoji biologických, biochemických, diagnostických a terapeutických procesů v čase s přesnou lokalizací původu signálu. K tomuto jsou využívány techniky jednofotonové emisní počítačové tomografie (**S**ingle **P**hoton **E**mission **C**omputed **T**omography, **SPECT**) a pozitronové emisní tomografie (**P**ositron **E**mission **T**omography, **PET**), které jsou schopné detekovat již subnanomolární koncentrace radioaktivních kontrastních látek s rozlišením řádově mezi 0,5–5 mm.[2] Pro získání přesné lokace původu signálu v organismu je vhodné výše zmíněné metody kombinovat s jinými technikami, které poskytnou lepší anatomickou informaci, např. s počítačovou tomografií (**C**omputed **T**omography, **CT**) nebo magnetickou rezonancí (**M**agnetic **R**esonance **I**maging, **MRI**).

Jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT)

Tato zobrazovací metoda je založena na detekci fotonů o určité energii (100–250 keV), které jsou emitovány γ -zářiči. Záření mimo toto rozmezí vede naopak ke snížení kvality výsledného obrazu.[3] Během vyšetření obíhá scintilační kamera kolem těla pacienta a postupně snímá rovinné řezy kolmé na osu rotace kamery. Z těchto řezů se následně počítačovou rekonstrukcí složí trojrozměrný obraz distribuce radiofarmaka v těle pacienta.

Nejpoužívanějším radionuklidem pro metodu SPECT je ^{99m}Tc (poločas přeměny $\tau_{1/2} = 6,02 \text{ h}$), další používané jsou např. radionuklidy ^{111}In a ^{67}Ga . Metoda SPECT má

rozlišení zhruba 5 cm^3 , což je v porovnání s jinými metodami, např. dále rozebíranou metodou PET, poměrně nízké rozlišení. Nutno brát ale do úvahy, že metoda SPECT je podstatně méně finančně náročná než PET.

Pozitronová emisní tomografie (PET)

Zobrazovací metoda PET je založena na souběžné detekci dvojice fotonů γ záření, která má původ v anihilaci pozitronu emitovaným radionuklidem a elektronu tkáně. Tyto fotony mají shodnou energii (511 keV) a vylétávají z místa vzniku v přesně opačných směrech. Tím je jasně definováno místo vzniku a následně počítačovou rekonstrukcí tvořen obraz distribuce radiofarmaka. Rozlišení metody je v klinickém uspořádání menší než 1 cm^3 . [4][5]

Nejvíce používané radiofarmakum pro toto vyšetření je 2-deoxy-2(^{18}F)fluor-D-glukóza (FDG; poločas rozpadu radionuklidu ^{18}F $\tau_{1/2} = 110 \text{ min}$). FDG má stejně jako glukóza vysokou afinitu k nádorovým tkáním, kde je fosforylována. FDG nemůže být metabolizována, dochází tedy k jejímu hromadění v buňkách, což má za následek zvýšení aktivity v rakovinných buňkách. FDG je vychytávána i buňkami nerakovinnými, které mají zvýšenou spotřebu glukózy, např. zánětlivými ložisky. [6] Dalšími používanými radionuklidy pro metodu PET jsou ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , z kovů například ^{64}Cu , ^{68}Ga či ^{86}Y .

1.2 Tomografie magnetické rezonance (MRI)

Snímkování magnetickou rezonancí (**M**agnetic **R**esonance **I**maging – MRI, v češtině se též používá zkratka MR) je jednou z nejvyužívanějších zobrazovacích metod v medicíně. Počet vyšetření MRI ročně stále stoupá; stoupá ale také počet MRI přístrojů mimo klasickou medicínu - tomografie MRI nachází využití také v medicíně veterinární a v dalších oblastech. [7][8]

Jednou z několika výhod této neinvazivní metody je předně absence ionizujícího záření (použité záření je v oblasti rádiových vln), kterému je pacient vystaven při jiných vyšetření, např. vyšetření počítačovou tomografií (CT) či výše zmíněnými metodami SPECT a PET. Technikou MRI lze navíc dosáhnout rozlišení až v řádech desetin mm.

Další nespornou výhodou je rozlišení tkání a vnitřních orgánů bez použití vnějších farmak, čímž se minimalizuje zatížení pacienta.

Samotná technika MRI tomografie je založena na fyzikálním principu nukleární magnetické rezonance (NMR), přičemž většina MRI technik používaná v medicíně je založena na sledování signálů vody, její koncentrace a prostorových změn relaxačních časů vodíkových (^1H) jader vody. V závislosti na chemických podmínkách kolem sledovaných jader (pH, pohyblivost, viskozita, iontová síla prostředí aj.) se liší i relaxační časy.[3][4] Tuková tkáň například obsahuje menší množství vody a vodíková jádra těchto molekul vody mají velice krátké T_1 relaxační časy a dlouhé T_2 relaxační časy. Je to dáno přesnou definovaností tkáně a malou pohyblivostí molekul vody. Oproti tomu naopak svalová nebo mozková tkáň jsou tvořené až ze 70 % vodou (tuková tkáň obsahuje jen cca 10 % vody), která je pohyblivá a relaxuje podstatně pomaleji.[11]

Jednou z nevýhod této metody je ale relativně nízký kontrast, pokud je třeba zobrazit drobné detaily, např. malé léze nebo jiné abnormality ve tkáních. Pro zvýšení kontrastu výsledného obrazu je možné pacientovi podat tzv. „kontrastní látku“ (CA, Contrast Agent), což je farmakum ovlivňující relaxaci vodíkových jader vody.[4] Jedná se o paramagnetické látky; nejčastěji komplexy trojmocného gadolinia s koordinovanou molekulou vody. Takové komplexy zvyšují rychlost T_1 relaxace, čímž poskytují tzv. pozitivní kontrast (místa s výskytem kontrastní látky jsou na snímcích světlé). Tyto přípravky se také nazývají „ T_1 kontrastní látky“. Další možností je použití superparamagnetických nanočástic, např. oxidů železa, které snižují T_2 relaxační čas, čímž poskytují negativní kontrast (místa s výskytem kontrastní látky jsou na snímcích tmavé).[12] U 35 % vyšetření pomocí magnetické rezonance jsou pro zvýšení kontrastu využívány kontrastní látky, jejichž dávky se pohybují v milimolárních množstvích.[13]

1.3 Jádru ^{19}F a MRI

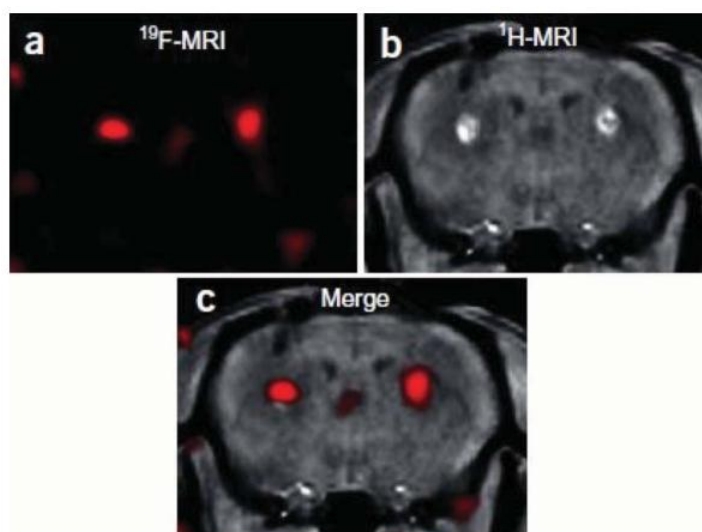
Ovšem v jistých případech ani použití kontrastní látky nestačí pro dosažení dostatečného kontrastu na snímcích kvůli rušení či snížení kontrastu způsobenému vlastními vodíkovými atomy, což ztěžuje interpretaci.[14] MRI snímání lze samozřejmě použít na jakékoliv jiné NMR aktivní jádro, přičemž výzkumy se zaměřily na jádro ^{19}F , a to pro podobnost NMR vlastností s jádrem ^1H (rezonanční frekvence ^{19}F na 100 MHz spektrometru je 94,077 MHz) a 100% izotopové zastoupení. Kvůli podobnosti zmíněných jader je možné použití standardních MRI přístrojů s pouze

drobnými softwarovými a hardwarovými úpravami, což snižuje náklady na tuto metodu.[12]

Za pozornost stojí i fakt, že první ^{19}F fantomové snímky byly pořízeny již na konci 70. let, jen několik let po sestrojení prvních MRI přístrojů. První *in vivo* snímky byly publikovány v polovině let osmdesátých, kdy byly pořízeny snímky břišní dutiny myši. Prvních zhruba 20 let práce na tomto tématu shrnuje review Jian-Xina Yu z roku 2005 publikované v *Current Medicinal Chemistry*. [15]

Jádro ^{19}F nemá v těle žádné přirozené pozadí, neb se prakticky nevyskytuje v žádné tělní tekutině, ale pouze v pevných tkáních zubů a kostí, kde ovšem příliš rychlá T_2 relaxace pevně vázaných fluoridů v těchto tkáních zapříčiňuje nedetekovatelnost jejich signálů. Jediným zdrojem signálů je tedy pouze podané farmakum do těla pacienta; v literatuře se setkáváme s termínem „hot spots“ či „second color“. Toho lze využít např. při sledování distribuce fluorovaných léčiv nebo při designu fluorovaných kontrastních látek a MRI sond, které mění své relaxační vlastnosti na základě změny prostředí (např. pH, přítomnost specifického enzymu apod.). [7][10][11]

Z ^{19}F MRI snímků tedy získáme pouze informaci o distribuci fluorovaného léčiva v těle pacienta, ale žádnou anatomickou informaci. Z tohoto důvodu je třeba kombinovat tuto metodu s jinou zobrazovací technikou, např. standardním ^1H MRI či CT. Překryv výsledných obrazů dá obraz s nejvyšším kontrastem, jak je pro ilustraci zobrazeno v Obr. 1.1. [18]



Obr. 1.1: (a) Bazální ganglia myši zobrazené pomocí ^{19}F kontrastní látky, (b) ^1H MRI bez použití kontrastu a (c) překryv snímků; převzato z lit. [18]

1.3.1 Kontrastní látky pro ^{19}F MRI

K získání dostatečného kontrastu v MRI snímcích je třeba dostatečná intenzita signálů těchto ^{19}F kontrastních látek. Toho lze dosáhnout několika způsoby. Prvním z nich je zvýšení koncentrace daného farmaka v těle pacienta. To ale není vždy v organismu možné či vhodné. Druhá možnost je úprava relaxačních parametrů. Relaxační parametry se dají „ladit“ obdobně jako relaxační parametry vodíkových jader molekul vody v těle – zavedením paramagnetického centra, které bude měřená jádra ovlivňovat. Jako paramagnetické centrum lze využít jak ionty kovů z řad lanthanoidů, tak ionty kovů přechodných – zde se nabízí např. ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} či Cr^{3+} . Výhodou použití přechodných kovů by byla např. cena a hlavně nižší toxicita.[19]

Jedním z hlavních kritérií je tedy zavedení fluorových atomů dostatečně blízko paramagnetického centra. Samotné požadavky na změny relaxačních časů jsou z kvalitativního hlediska stejné jako u protonového MRI, tedy je třeba najít vhodný poměr T_1 a T_2 relaxačních časů k získání pozitivního kontrastu. Kvantitativně se ale požadavky liší. U protonového MRI hrají významnou roli ještě další požadavky – rychlost výměny koordinované vody, rychlost rotace molekuly v roztoku a další parametry. Při hledání správného strukturního motivu fluorovaných kontrastních látek je třeba brát v potaz, že fluorové atomy jsou vázané kovalentně a k samotnému paramagnetickému centru se nekoordinují. Nedochází zde k žádné výměně jako u kontrastních látek používaných pro ^1H MRI, kde dochází k výměně koordinované vody. Z toho vyplývá, že se dá nadefinovat průměrná vzdálenost atomů fluoru od paramagnetického centra. A tato vzdálenost musí být optimální, aby dostatečně zkracovala T_1 relaxační čas, ale zároveň příliš nezkracovala relaxační čas T_2 . Dalším kritériem pro strukturu je co nejvyšší počet magneticky ekvivalentních atomů fluoru. Během měření je totiž důležitým kritériem koncentrace fluorových jader v roztoku, přičemž čím vyšší počet jader v jedné molekule kontrastní látky, tím je potřeba nižší koncentrace látky samotné. Magnetická ekvivalence jader je vyžadována pro samotné měření, aby fluorová jádra poskytovala právě jeden signál, čímž by se v praxi nemuselo používat širokospektrálního pulsu, což by zjednodušilo měření.[20] V neposlední řadě je zde kritérium na termodynamickou stabilitu a hlavně na kinetickou inertnost připraveného komplexu, aby v těle nedocházelo k transmetalaci (výměna iontu kovu v komplexu) či transchelataci (výměna ligandu na iontu kovu), neb volné ionty kovů jsou silně toxické.[4] Toto kritérium je více diskutováno v kap. 1.5.

Fyzikální princip ^{19}F kontrastních látek s paramagnetickým centrálním atomem[13][15]

V neviskózních roztocích paramagnetických molekul (v našem případě tedy kontrastních látek s centrálním paramagnetickým iontem) probíhá 5 relaxačních procesů jader ^{19}F : anizotropie chemického posunu (Chemical Shift Anisotropy – CSA), interakce dipól-dipól (DD) s ostatními jádry, kontaktní interakce elektron-jádro, DD interakce elektron-jádro a relaxace způsobená náhodnými změnami DD interakce, také známá jako Curieho relaxace.

V případě skupiny CF_3 je anizotropie chemického posunu malá, tudíž ji lze v modelech zanedbat. DD interakce jádro-jádro lze zanedbat též, poněvadž je zcela překryta DD interakcí elektron-jádro vyvolané paramagnetikem, jejíž velikost se pohybuje řádově ve stovkách Hz, zatímco interakce jádro-jádro pouze v jednotkách Hz.

DFT výpočty ukázaly, že kontaktní interakce jádro-elektron lze za určitých podmínek taktéž zanedbat. A to v případě, pokud je ^{19}F atom ve vzdálenosti od f -orbitalu s nepárovými elektrony větší než 5 Å. Toto zanedbání je tedy možné u kontrastních látek, kde je komplexován ion kovu z lanthanoidové řady a které splňují strukturní požadavek ohledně vzdálenosti centrální ion-atom ^{19}F . Jak je tento předpoklad aplikovatelný na potenciální kontrastní látky s centrálním iontem d -prvku či který nesplňuje požadavek vzdálenosti větší než 5 Å, není zcela jasné.[21]

Po zanedbání 3 výše zmíněných interakcí získáme rovnice (1) a (2) popisující relaxační rychlosti R_1 a R_2 (v s^{-1}), kde první člen popisuje DD interakci jádro-elektron a člen druhý Curieho relaxaci:

$$R_1 = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_F^2 \mu_{\text{ef}}^2}{r^6} \left(\frac{7\tau_{\text{R+e}}}{1 + \omega_e^2 \tau_{\text{R+e}}^2} + \frac{3\tau_{\text{R+e}}}{1 + \omega_F^2 \tau_{\text{R+e}}^2} \right) + \frac{2}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_F^2 \mu_{\text{ef}}^4}{(3kT)^2 r^6} \frac{3\tau_{\text{R}}}{1 + \omega_F^2 \tau_{\text{R}}^2} \quad (1)$$

$$R_2 = \frac{1}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_F^2 \mu_{\text{ef}}^2}{r^6} \left(4\tau_{\text{R+e}} + \frac{3\tau_{\text{R+e}}}{1 + \omega_F^2 \tau_{\text{R+e}}^2} + \frac{13\tau_{\text{R+e}}}{1 + \omega_e^2 \tau_{\text{R+e}}^2} \right) + \frac{1}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_F^2 \mu_{\text{ef}}^4}{(3kT)^2 r^6} \left(4\tau_{\text{R}} + \frac{3\tau_{\text{R+e}}}{1 + \omega_F^2 \tau_{\text{R}}^2} \right) \quad (2)$$

kde μ_0 je permeabilita vakua, γ_F gyromagnetický poměr jádra ^{19}F , r vzdálenost jádra ^{19}F od elektronů paramagnetického centra, τ_R rotační korelační čas, ω_F Larmorova frekvence jádra ^{19}F , T je absolutní teplota (v K) a k je Boltzmannova konstanta. Veličiny ω_e a τ_{R+e} jsou definovány vztahy (3) a (4):

$$\omega_e = \left(\frac{g_J \mu_B}{\hbar} \right) B_0 \quad (3)$$

$$\tau_{R+e} = (\tau_R^{-1} + T_{1e}^{-1})^{-1} \quad (4)$$

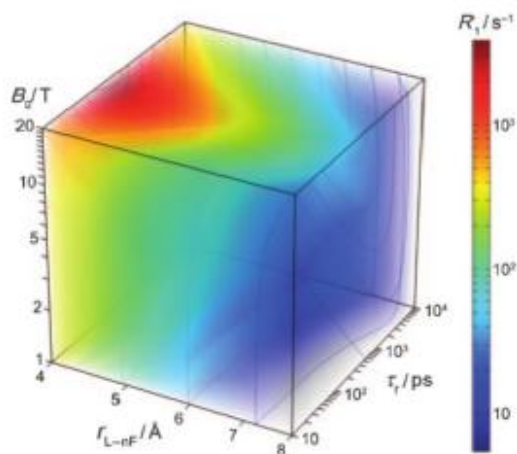
kde g_J je efektivní elektronový g -faktor, B_0 indukce externího magnetického pole, μ_B Bohrův magneton, \hbar redukovaná Planckova konstanta a T_{1e} podélný relaxační čas elektronu. V případě elektronové relaxace je předpoklad, že podélná (longitudinální) rychlost relaxace je stejná jako příčná (transverzální) rychlost relaxace.

Veličina μ_{ef} je celkový magnetický dipólový moment paramagnetika. Pro f -prvky jej lze s dobrou přesností vypočítat z celkového momentu hybnosti popsaného kvantovým číslem J a to vztahem (5):

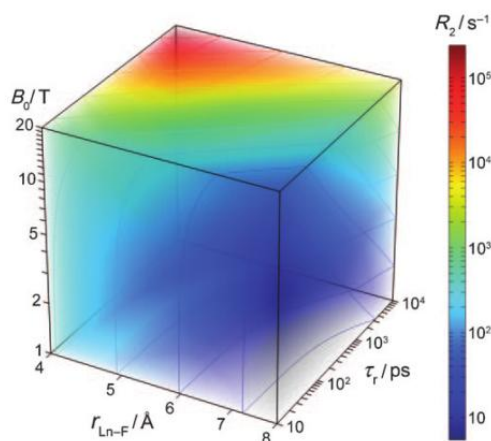
$$\mu_{ef}^2 = g_J^2 \mu_B^2 J(J+1) \quad (5)$$

Velikosti některých veličin z rovnic (1)–(5) jsou známé a lze je tedy v rovnicích (1) a (2) považovat za fixní; např. celkový magnetický dipólový moment μ_{ef} je daný pro každý paramagnetický ion, navíc u f -prvků není významněji ovlivněn ligandovým okolím. Relaxační čas elektronu T_{1e} je obvykle velmi krátký a pohybuje se okolo 0,2 ps.

Zbývají tedy 3 nezávislé proměnné, a to rotační korelační čas τ_R , magnetická indukce vnějšího magnetického pole B_0 a vzdálenost paramagnetického centra a atomu fluoru r . Jejich vliv na relaxační časy atomů ^{19}F R_1 a R_2 lze vyčíst z prostorových grafů zobrazených na Obr. 1.2 a 1.3.



Obr. 1.2: Změna rychlosti relaxace R_1 s velikostí vnějšího magnetického pole B_0 , střední vzdáleností atomu ^{19}F od paramagnetika r a rotačním korelačním čase molekuly τ_R , s pevně danými parametry $\mu_{\text{ef}} = 10 \mu_B$ a $T_{1e} = 0,2$ ps dle rovnice (1); převzato z lit.[21]



Obr. 1.3: Změna rychlosti relaxace R_2 s velikostí vnějšího magnetického pole B_0 , střední vzdáleností atomu ^{19}F od paramagnetika r a rotačním korelačním čase molekuly τ_R , s pevně danými parametry $\mu_{\text{ef}} = 10 \mu_B$ a $T_{1e} = 0,2$ ps dle rovnice (2); převzato z lit.[21]

Z těchto grafů lze vyčíst několik zjevných trendů.

První z nich, že relaxační čas R_2 , který způsobuje rozšiřování až možné vymizení signálu, roste s klesající vzdáleností r , s rostoucí magnetickou indukcí vnějšího pole B_0 a s rostoucím korelačním časem τ_R .

Druhým trendem je, že rychlost relaxace R_1 , kterou je žádoucí mít co nejvyšší, vykazuje lokální maxima v závislosti na korelačním čase τ_R pro každou hodnotu magnetické indukce B_0 a vzdálenosti jader ^{19}F od paramagnetického centra r . Tato maxima se nachází v bodech, pro která platí výraz (6):

$$\omega_F = \frac{1}{\tau_R} \quad (6)$$

Výraz (6) lze také získat analýzou rovnice (1).

Uvedený rozbor relaxačních časů R_1 a R_2 byl utvořen na modelu, kdy centrální ion bude z řady lanthanoidů, je ale aplikovatelný i na látky, jejichž paramagnetické centrum je z řady d -prvků, např. ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} či Cr^{3+} .

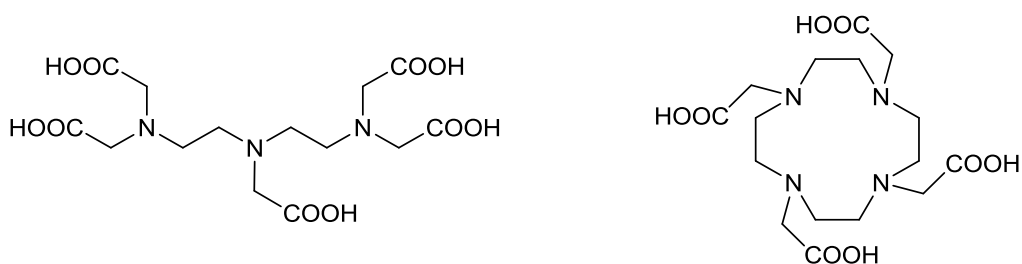
Na základě zvoleného paramagnetického centra se dají vynést obdobné grafy pro jinou fixní hodnotu μ_{ef} , která se mění se zvoleným paramagnetikem, a následně může sloužit jako vodítko pro návrh ligandu, aby splňoval potřebné požadavky na R_1 a R_2 .

Strukturní motivy ^{19}F kontrastních látek

Jedním ze studovaných strukturních typů pro ^{19}F MRI jsou micely. Micely jsou kulovité útvary amfifilních molekul; ve vodných roztocích se uspořádávají tak, že hydrofobní části molekul se asociují uvnitř micely, zatímco hydrofilní část tvoří povrch micely. Těmto typům kontrastních látek byla věnována pozornost asi 20 let, neb pomalý rotační korelační čas molekuly se ukázal být klíčový ve snížení T_1 a T_2 relaxačních časů.[14] Tento typ kontrastních látek poskytuje možnost navěšení různých funkčních skupin, ať už na lipofilní či hydrofilní část micely, což otevírá dveře přípravě různých targetujících látek či přípravě sond vhodných pro zobrazování více metodami.[7][13] V roce 2014 byl např. publikován článek Murarem *et al.* o fluorovaných blokových kopolymerech obsahující 2,2,2-trifluorethyl(meth)akrylátové a oligo(ethylenglykol)-methylether(meth)akrylátové jednotky. Byly vytvořeny dvě série fluorovaných kopolymerů, které se lišily distribucí hydrofilních a hydrofobních domén. Obě série kopolymerů ve vodě tvořily micely, a tyto roztoky byly následně testovány jakožto potenciální kontrastní látky pro ^{19}F MRI. První série příliš neuspěla – signály ^{19}F byly rozšířené a štípané. Oproti tomu druhá série připravených kopolymerů dávala při měření ^{19}F MRI úzký pík a T_1 relaxační čas byl typický pro micelární struktury.[22]

Dalším strukturním motivem jsou dendrimerní struktury. Dendrimery jsou skupina makromolekulárních látek o velikosti v řádu nanometrů, které jsou dobře definované, s opakovanými motivy vycházejícími z jednoho centra. U této skupiny látek je také možnost určité selektivity a tento design poskytuje možnosti dalšího výzkumu, např. konjugací s targetující skupinou na periferii dendrimeru lze získat velice specifickou targetující kontrastní látku pro značení různých typů tkání.[23]

Třetím strukturním motivem jsou komplexy kovů odvozené od kontrastních látek pro ^1H MRI. Existují dva hlavní strukturní typy – lineární struktura a struktura makrocyclu; na obr. 1.4 jsou zobrazeny ligandy DTPA a DOTA jakožto základní prototypy zmíněných struktur. V obou případech se jedná o polyaminokarboxylátové ligandy, které mají 8 donorových atomů. V komplexech, jejichž centrální atom preferuje 9 donorových atomů, je deváté místo obsazeno atomem kyslíku z koordinované molekuly vody.[4]



Obr. 1.4: Struktura DTPA (vlevo) a DOTA (vpravo)

V literatuře se setkáváme s ligandy s využitím pro ^{19}F MRI odvozenými výhradně od struktury DOTA, tzv. „DOTA-like“ ligandy, což je zapříčiněné vyšší stabilitou komplexů a vyšší symetrií výsledné struktury (viz kapitola 1.4).[4] Dalším důvodem může být také jednodušší příprava navržených derivátů. Takřka veškeré ligandy pro ^{19}F MRI založené na struktuře DOTA jsou různé amidové deriváty; CF_3 skupina je tedy vázána na alkylový či arylový zbytek a přes amidovou vazbu připojena na pendantní acetátovou skupinu. Série kontrastních látek výše popsaných struktur byly poprvé publikovány roku 2007, jakožto ^{19}F MRI sondy reagující na změny pH prostředí. Jeden z publikovaných ligandů např. vykazoval koordinaci dusíku sulfoamidové skupiny jakožto odpovědi na změnu pH.[24]

Na tuto publikaci později navázaly další Parkerovy studie. Jedna z nich se zabývala obdobnými komplexy lanthanoidů, které taktéž mají odezvu na změnu pH.[21] V roce 2012 byly v *Journal of Inorganic Chemistry* (taktéž Parkerem *et al.*)

publikovány 2 ligandy, ve kterých je karboxylová skupina nahrazena skupinou fosfinátovou či fosfonátovou.[25]

1.4 Termodynamická stabilita a kinetická inertnost komplexů

Toxicita volných Ln^{3+} iontů je velmi vysoká. Proto jsou jedněmi z velmi důležitých vlastností potenciálních kontrastních látek termodynamická stabilita a kinetická inertnost komplexů.

Mírou stability komplexu je termodynamická konstanta stabilita K (7), která se nejčastěji vyjadřuje v logaritmické škále. Protože *in vivo* podmínky jsou specifické přítomností nadbytku jiných iontů a potenciálních ligandů a změnami pH, je často uváděna též podmíněná konstanta stability K^* , která je definována vztahem (8):

$$K = \frac{[\text{M}(\text{L})]^{x-y}}{[\text{M}^{x+}][\text{L}^{y-}]} \quad (7)$$

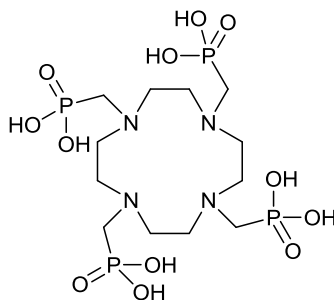
$$K^* = \frac{[\text{M}(\text{L})]^{x-y}_{\text{tot}}}{[\text{M}^{x+}]_{\text{tot}}[\text{L}^{y-}]_{\text{tot}}} \quad (8)$$

kde K je termodynamická konstanta, M centrální atom, L ligand, K^* podmíněná termodynamická konstanta, index „tot“ značí celkové množství dané látky; u ligandu zahrnuje i různě protonizované částice, viz vztah (9) a (10).

$$[\text{M}]_{\text{tot}} = [\text{M}] + [\text{M}(\text{L}_1)] + [\text{M}(\text{L}_2)] \dots \quad (9)$$

$$[\text{L}]_{\text{tot}} = [\text{ML}] + [\text{L}] + [\text{HL}] + \dots + [\text{H}_n\text{L}] \quad (10)$$

V Tabulce 1.1 jsou uvedeny termodynamické konstanty stability vybraných ligandů – DTPA, DOTA, DOTP (struktura zobrazena na obr. 1.5) – s Gd^{3+} a nejběžnějšími biogenními kovy.



Obr. 1.5: Struktura ligandu DOTP

Tabulka 1.1: Termodynamické konstanty stability vybraných ligandů s vybranými kationty

| Ligand | logK | | | | zdroj |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Gd(L) | Ca(L) | Zn(L) | Cu(L) | |
| DTPA | 22,5 | 10,8 | 18,6 | 21,5 | [26] |
| DOTA | 24,7 | 16,4 | 18,7 | 22,7 | [27] |
| DOTP | 28,8 | 11,1 | 24,8 | 25,4 | [28] |

Z Tabulky 1.1 lze jasně vidět, že makrocyclické ligandy (DOTA, DOTP) tvoří stabilnější komplexy než ligandy lineární (DTPA).

V *in vivo* podmínkách je navíc kontrastní látka ve velmi malé koncentraci; ve fyziologickém prostředí se setkává s nadbytkem endogenních kationtů (např. Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+}), které mohou nahradit centrální ion v kontrastní látce (proces „*transmetalace*“). Stejně tak se v organismu nachází velké množství látek, např. proteinové povahy, které mohou sloužit jako ligand těžkého kovu (proces „*transchelatace*“). V neposlední řadě je vhodné zmínit, že při *in vivo* podmínkách dochází i ke změnám pH. V *in vivo* prostředí se kontrastní látka s nízkými hodnotami pH setkává v ledvinách (hodnota pH okolo 4,5), příp. v nádorových buňkách (hodnoty pH 5,6–7,4). Tyto změny koncentrace H^+ iontů mohou mít vliv na protonizaci ligandu a tím na stabilitu komplexu (proces „*kyselá disociace*“). Proto nejsou termodynamické parametry zcela rozhodující. Kinetická inertnost může být např. definována poločasem disociace komplexu v prostředí silné minerální kyseliny (např. při pH = 1). Tabulka 1.2 ukazuje srovnání inertnosti komplexů Gd-DTPA a Gd-DOTA.

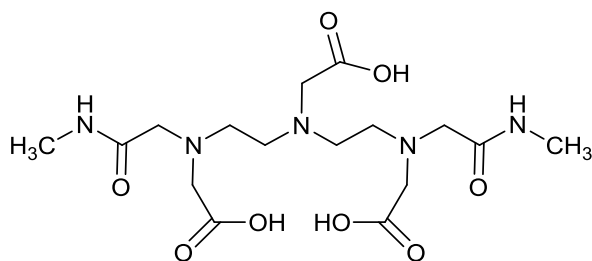
Tabulka 1.2: Srovnání kinetické inertnosti komplexů Gd-DTPA a Gd-DOTA, převzato z lit.[29]

| Komplex | $T_{1/2}$ (pH = 1) | Míra disociace [Gd(L)] po 15 minutách stání ve fosfátovém pufru [Gd(L)] = [M^{2+}] = 25 mM | |
|---------|--------------------|---|-------|
| | | Cu(L) | Zn(L) |
| Gd-DTPA | 10 min | 25 % | 21 % |
| Gd-DOTA | 1 měsíc | < 1 % | < 1 % |

Vyšší kinetickou inertnost komplexu Gd-DOTA oproti komplexu Gd-DTPA, resp. obecně komplexů s makrocyclickými ligandy oproti komplexům s ligandy

lineárními, je možné vysvětlit mechanismem dekomplexace. Uvolnění centrálního iontu v silně kyselém prostředí probíhá přes protonizaci a dekoordinaci donorových atomů. Ion H^+ je zachycen záporně nabitou funkční skupinou a přenesen na nejbazičtější atom v molekule. Tím je u polyaminokarboxylových ligandů atom dusíku aminové skupiny. U lineárních komplexů je tento proces jednoduchý a dochází při něm k odklopení části ligandu, proto dochází k dekomplexaci snáze než u makrocyclických ligandů, kde je mechanismus dekomplexace podstatně složitější. Při přenesení protonu na dusíkový atom makrocyclu v Ln-DOTA je dekoordinovaná aminoskupina stále držena v blízkosti Ln^{3+} a ion Ln^{3+} je stále koordinován kyslíkatými atomy karboxylových skupin a může se snadno vrátit zpět do dutiny makrocyclu. [30][31]

Jedním z důvodů, proč se dnes více dbá na stabilitu a internost komplexů, byl vznik nemoci zvané „*nefrogenní systémová fibróza*“ (NSF). Od roku 2007 se začala objevovat tato nová, velmi vzácná choroba, která se projevovala lokálním ztvrdnutím kůže, bolestmi kloubů a selháním srdce, plic či jater. Příčinu této nemoci se podařilo zjistit až po cca 10 let po prvních zaznamenaných případech. Všichni pacienti měli společné právě dvě věci – sníženou renální filtraci (tedy trpěli poškozením ledvin) a podstoupili MRI vyšetření s kontrastní látkou Omniscan[®] (zobrazeno na Obr. 1.6). Kvůli snížené funkci ledvin kolovalo farmakum v těle delší čas než u zdravých pacientů, přičemž se jednalo o dostatečně dlouhou dobu, aby došlo k dekomplexaci Gd^{3+} . Tím došlo ke chronické otravě gadoliniovými ionty, která způsobovala výše popsané symptomy.[32] Přípravek Omniscan[®] je stále používán v klinické praxi, ovšem nesmí se podávat pacientům se sníženou funkcí ledvin.[33] Po této zkušenosti začal být kladen větší důraz na stabilitu komplexů *in vivo*.



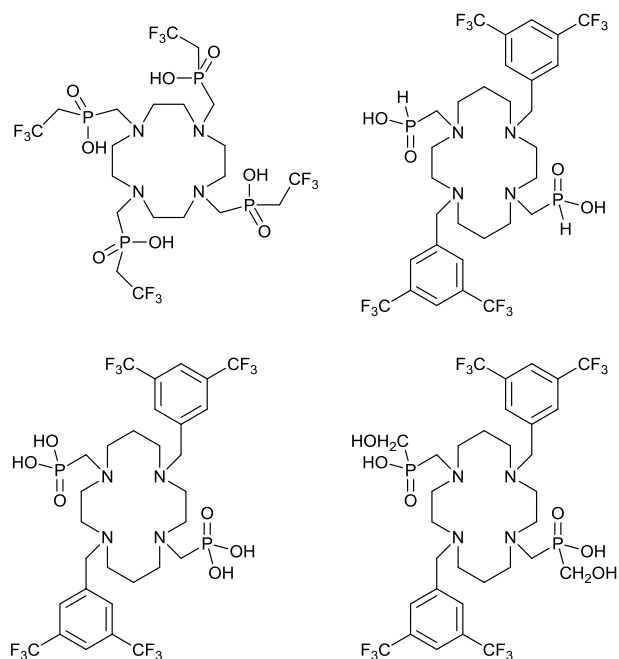
Obr. 1.6: Struktura ligandu kontrastní látky Omniscan[®]

2. Cíle práce

Předložená diplomová práce si klade za cíl přípravu a studium makrocyclických ligandů s pendentními rameny obsahující atomy ^{19}F s potenciálním využitím jakožto kontrastních látek pro ^{19}F MRI.

Byly navrženy 4 ligandy, které jsou zobrazeny na Obr. 2.1. Jeden je odvozen od struktury cykленu pro komplexaci trojmocných iontů lanthanoidů, zbylá série tří ligandů je odvozena od struktury cyklamů pro komplexaci nikelnatých kationtů.

Práce si klade za cíl studium připravených ligandů a jejich komplexů, a zjištění relaxačních časů atomů ^{19}F na pendentních ramenech.



Obr. 2.1: Navržené ligandy s potenciálním využitím pro ^{19}F MRI

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla byly produkty firem Fluka, Lach-Ner, Chema-tech, Sigma Aldrich, Strem Chemicals, Across Organics, Fluorochem a Penta. S výjimkou diethyletheru a THF nebyly chemikálie dále čištěny ani sušeny.

Roztok hydroxylaminu byl připraven dle lit. [34].

Deuterovaná rozpouštědla pro měření NMR spekter

| | |
|----------------------------------|-----------------|
| D ₂ O, 99,8 % D | Armar Chemicals |
| CD ₃ OD | Armar Chemicals |
| CDCl ₃ | Sigma Aldrich |

Iontoměniče a sorbenty

silikagel, Silicagel 60–230 mesh

silný kationtový iontoměnič, Dowex 50, 50–100 mesh

Detekční činidla pro TLC

Ninhydrin, 0,5% ethanolický roztok

CuSO₄, 10% vodný roztok

3.2 Metody charakterizace

3.2.1 NMR spektroskopie

Měření NMR ¹H, ¹³C, ¹⁹F a ³¹P spekter byla provedena na spektrometru VNMR300 a spektrometru Bruker Avance (III) 600. Hodnoty chemických posunů δ

jsou uvedeny v jednotkách ppm a jsou zaokrouhleny na dvě desetinná místa. Interakční konstanty J jsou uvedeny v jednotkách Hz a jsou zaokrouhleny na tři platné cifry. Multiplicita signálů byla označena následujícími zkratkami: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), p (pentet), m (multiplet), br (široký). Některá ^{31}P spektra a všechna ^{13}C spektra byla měřena s dekaplinkem vodíkových jader. NMR spektra byla měřena při teplotě 25 °C, pokud není uvedeno jinak. Chemické posuny v ^1H a ^{13}C spektrech byly při měření v D_2O referencovány na interní standard $t\text{BuOH}$ ($\delta_{\text{H}} = 1,25$; $\delta_{\text{C}} = 29,13$). Při měření v jiných rozpouštědlech byla spektra referencována na zbytkový signál lehkého rozpouštědla: CD_3OD ($\delta_{\text{H}} = 3,34$; $\delta_{\text{C}} = 49,86$), CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,26$; $\delta_{\text{C}} = 77,36$). Při měření ^{31}P spekter byl jako externí standard použit 85% roztok H_3PO_4 v D_2O ($\delta_{\text{P}} = 0,00$), při měření ^{19}F spekter byl použit jako externí standard 0,1 M roztok CF_3COOH v D_2O ($\delta_{\text{F}} = -76,55$).

Ke stanovení koncentrace komplexů $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ byla použita Evansova metoda BMS.[35]

Spektra měřená na spektrometru Bruker Avance (III) 600 byla měřena Mgr. Janem Blahutem a Mgr. Tomášem Davidem, Ph.D.

3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-iontrap s detekcí v pozitivním i negativním modu. Vzorky byly rozpuštěny a ředěny MeOH.

U charakterizací jednotlivých látek jsou uvedeny pouze signály, které se podařilo interpretovat.

3.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na destičkách TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} (Merck). Příslušné mobilní fáze a metody detekce jsou uvedeny vždy u jednotlivých látek. Hodnoty R_f jsou uvedeny na dvě desetinná místa.

3.2.4 Elementární analýza

Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze na analyzátoru Perkin Elmer 2400 II. Hmotnostní procenta jsou uváděna na dvě desetinná místa.

3.2.5 Rentgenostrukturní analýza

Rentgenostrukturní analýza monokrystalů byla provedena na přístroji ApexII CCD s plošným detektorem za chlazení na teplotu 150 K kapalným dusíkem.

Data byla změřena a struktury vyřešeny RNDr. Ivanou Císařovou, CSc. a vypřesněny doc. RNDr. Janem Kotkem, Ph.D.

3.2.6 Relaxační studie

Relaxační studie *in vitro* a *in vivo* byly provedeny na Institutu klinické a experimentální medicíny na MRI spektrometru Bruker 4,7T opatřeného jednozávitovou cívkou pro $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ měření.[36] Experimenty byly měřeny Mgr. Vítem Herynkem, Ph.D. a Ing. Danielelem Jirákem, Ph.D.

3.3 Syntetická část

3.3.1 Příprava 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny

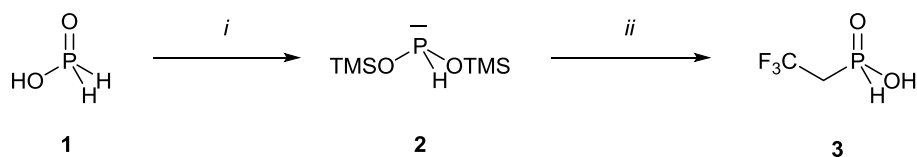


Schéma 3.1: Syntéza 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny:

i: $\text{DIPEA}, (\text{CH}_3)_3\text{SiCl}/\text{DCM}$, RT; *ii*: $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{I}/\text{DCM}$, RT

Do 500mL trojhrdlé baňky s kulatým dnem bylo naváženo 5,00 g (75,8 mmol) H_3PO_2 (1) a aparatura byla sekurována. Za stálého míchání bylo přidáno 100 mL suchého DCM a roztok DIPEA vzniklý smísením 40 mL (230 mmol, 3 ekv.) DIPEA s 30 mL suchého DCM . Po chvíli byl přidán roztok trimethylsilylchloridu vzniklý smísením 30 mL (323 mmol, 4,25 ekv.) trimethylsilylchloridu a 20 mL suchého DCM . Vzniklá směs byla míchána 3 hodiny. Byl pozorován vznik bílé zakaleného roztoku látky 2. Poté bylo do reakční směsi přidán roztok alkylačního činidla vzniklého smísením 19,1 g (91,0 mmol, 1,2 ekv.) $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{I}$ a 15 mL suchého DCM . Směs byla ponechána v mírném proudu argonu cca 48 hodin. Následně byla reakční směs alkoholyzována přidavkem 50 mL MeOH . Suspenze byla odpařena do sucha na RVO . Bílá hmota byla rozpuštěna v 50 mL MeOH a znovu odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 20 mL destilované vody a přečištěn na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ cyklus, $3,5 \times 30$ cm, eluce vodou). Eluát byl odpařen do sucha na RVO . Vzniklý nažloutlý olej byl dočištěn sloupcovou chromatografií na SiO_2 (80 g SiO_2 , IPAV 5:1:1, $R_f(3) = 0,80$). Produkt byl dočištěn kationtovou chromatografií (Dowex 50, 50–100 mesh, $3,5 \times 30$ cm). Eluát byl odpařen do sucha na RVO . Bylo získáno 4,2 g žlutohnědého oleje (což přibližně odpovídá 40 % teoretického výtěžku).

Charakterizace:

TLC: IPAV 5:1:1, $R_f = 0,80$, detekce ninhydrinem

^1H NMR (299,9 MHz, D_2O): δ 2.80 (2H, m); 7,21 (1H, d, $^1J_{\text{HP}} = 566$)

^{31}P NMR (121,4 MHz, D_2O): δ 14,76 (1P, dm, $^1J_{\text{PH}} = 566$)

^{19}F NMR (282,2 MHz, D_2O): δ -58,67 (3F, q, $^3J_{\text{FH}} = ^3J_{\text{FP}} = 12,1$)

3.3.2 Příprava ethylesteru 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny

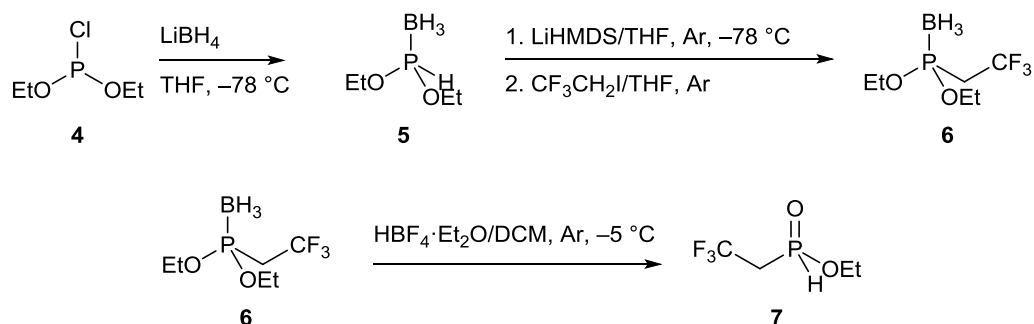


Schéma 3.2: Příprava ethylesteru 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny

Do trojhrdlé 250mL baňky bylo naváženo 3,04 g (19,4 mmol) $(\text{EtO})_2\text{PCl}$ (**4**) a přidáno 30 mL suchého THF. Baňka byla opatřena vzdušným chladičem, přívodem argonu a bublačkou. Jedno hrdlo bylo opatřeno pouze zátkou. Roztok byl 10 minut probubláván argonem a následně vychlazen směsí ethanol-suchý led. Poté bylo jednorázově přidáno 0,51 g (23,3 mmol; 1,2 ekv.) LiBH_4 . Po půl hodině bylo odstraněno chlazení a reakční směs byla ponechána ohřát na RT pod inertní atmosférou. Následně byla směs nalita do velké kádinky, ve které byla směs 115 g ledu a 18 mL konc. HCl . Bylo pozorováno silné kypění směsi. Směs byla ponechána ohřát na RT do úplného roztátí ledu a poté byla extrahována 3×100 mL EtOAc . Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezv. Na_2SO_4 , který byl následně odfiltrován přes papír. Roztok byl odpařen na RVO do sucha při teplotě lázně 45°C . Surový produkt byl přečištěn chromatografií na silikagelu (15 g, EtOAc :hexan 8:2, $R_f(\mathbf{5}) = 0,75$).

V ^{31}P NMR spektrech bylo pozorováno štípání signálu na dublet způsobené přítomností P–H vazby. Dále bylo pozorováno rozšíření signálu s náznaky štípání, s největší pravděpodobností způsobené přítomností boranového chránění. Ze spekter ovšem nebylo možné odečíst interakční konstanty J_{PB} .

Charakterizace:

TLC: EtOAc :hexan 1:1, $R_f = 0,75$, detekce ninhydrinem

^{31}P NMR (121,4 MHz, EtOAc): δ 124 (1P, dm, $^1J_{\text{PH}} = 502$)

^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (121,4 MHz, EtOAc): δ 124 (1P, b)

Do trojhrdlé 250mL baňky byl převeden veškerý produkt **5** rozpuštěný v 10 mL THF. Baňka byla sekurována, poté byl roztok zchlazen lázní ethanol-suchý led a aparatura byla znovu sekurována. Následně byla aparatura zcela uzavřena pomocí kohoutu a sept. Skrze septum bylo následně přidáno 19,4 mL LiHMDS (1M roztok v THF; 19,4 mmol), zatímco kohout aparatury byl pootevřen, aby nedocházelo k přetlaku v aparatuře. Po hodině byl přidán roztok $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{I}$ v THF vzniklý smísením 4,07 g alkylačního činidla $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{I}$ (19,4 mmol; 1 ekv.) s 39 mL THF; během jednorázového přidavku činidla byl kohout aparatury opět pootevřen a následně uzavřen. Roztok byl ponechán reagovat přes noc. Byl pozorován vznik tmavého až černého roztoku. K němu bylo přidáno 90 mL nasyceného roztoku NaCl a extrahováno 3×50 mL EtOAc. Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezv. Na_2SO_4 , který byl následně odfiltrován přes papír. Roztok byl odpařen na RVO při teplotě lázně 45 °C.

Byla získána směs produktů **6** a **5**, přičemž integrací ^{31}P NMR spekter bylo zjištěno, že alkylace proběhla z 90 %. Výslednou směs se nepodařilo rozdělit (nebyla nalezena žádná mobilní fáze, ve které by se látky vhodně dělily), proto poslední krok syntézy (odstranění BH_3 skupiny; získání produktu **7**) nebyl proveden.

Charakterizace:

^{31}P NMR (121,4 MHz, D_2O): δ 140 (1P, s)

3.3.3 Příprava *N*-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu

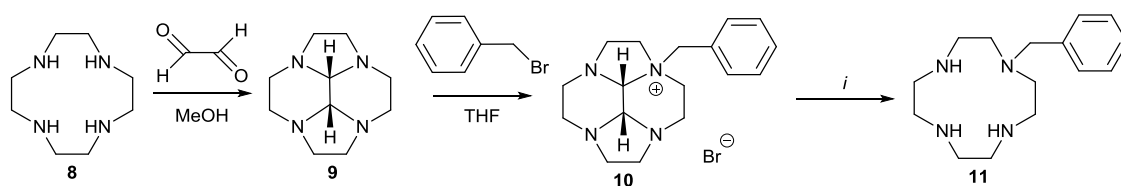


Schéma 3.3: Příprava *N*-benzyl-1,4,7,10-tetraazadodekanu: *i*: hydrazin, 120 °C/hydroxylamin, 120 °C

Do 250mL baňky bylo naváženo 4,30 g cyklu (8, 25,0 mmol) a rozpuštěno v 20 mL MeOH. Roztok byl lázní voda-led vychlazen na teplotu okolo 0 °C. Za stálého míchání chlazení byl během 30 minut přikapán roztok glyoxalu vzniklý smísením 3,70 g 40% roztoku glyoxalu (25,5 mmol, 1 ekv.) a 5 mL MeOH. Roztok byl ponechán míchat několik hodin. Následně byl odpařen do sucha a rozpuštěn v 50 mL Et_2O .

Organická fáze byla převedena do čisté předem zvážené baňky a odpařena do sucha. Vzniklá látka byla ponechána několik dní v exsikátoru nad P_2O_5 *in vacuo*. Celkem bylo připraveno 4,40 g *cis*-glyoxalcyklenu (**9**), což odpovídá 91 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

1H NMR (299,9 MHz, $CDCl_3$): δ 3,10 (2H, s, CH-můstek); 2,55; 2,72; 2,90; 2,99 (16H, m, cyklus)

Do 50mL baňky bylo naváženo 1,00 g (5,15 mmol) *cis*-glyoxalcyklenu (**9**) a přidáno 5 mL suchého THF. Do roztoku byl postupně za stálého míchání přidán roztok vzniklý smísením 0,90 g (5,26 mmol, 1 ekv.) BnBr rozpuštěného v 3 mL suchého THF. Po několika minutách byl pozorován vznik bílé suspenze, která byla ponechána míchat přes noc. Druhý den byla sraženina odfiltrována na fritě S3 a promyta malým množstvím suchého THF. Připravený produkt byl dosušen *in vacuo* nad P_2O_5 . Celkem bylo připraveno 1,44 g látky **10**, což odpovídá 77 % teoretického výtěžku.

NMR charakterizace není uvedena z důvodu špatné rozpustnosti produktu.

Charakterizace:

Elementární analýza: C: 55,38 %; H: 6,64 %; N: 14,68 %; Br: 22,97 % (teoreticky **10** = $C_{17}H_{25}BrN_4$ odpovídá C: 55,89 %; H: 6,90 %; N: 15,34 %; Br: 21,87 %)

Metoda A

Do 250mL baňky bylo naváženo 3,0 g látky **10**, ke kterému bylo přidáno 50 mL 65% roztoku hydrazinu a necháno reagovat při 120 °C pod zpětným chladičem přes noc. Druhý den bylo zahřívání ukončeno a směs ponechána vychladnout. Byl pozorován vznik emulze, ze které byla těžší fáze oddělena pomocí centrifugace. Získaný olej byl několikrát odpařen z EtOH a následně vysrážen konc. HCl. Byl získán nažloutlý prášek, který byl ještě přečištěn pomocí Et_2O . Získaná sraženina byla zfiltrována na fritě S3 a ponechána *in vacuo* nad P_2O_5 .

Bylo získáno celkem 16,3 g bílé sraženiny; elementární analýza ukázala silné znečištění chloridem hydrazinia, proto s touto směsí nebylo dále pracováno.

Metoda B

Do 50mL baňky bylo naváženo 1,5 g látky **10**, ke které bylo přidáno 25 mL 2M roztoku hydroxylaminu v bezv. EtOH. Směs byla ponechána refluxovat pod zpětným chladičem opatřeném chlorkalciovou trubicí. Další den bylo do směsi přidáno 25 g 10% roztoku NaOH a extrahováno 6×30 mL CHCl₃. Organické fáze byly spojeny a odpařeny do sucha na RVO. Následně byl odparek rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a převrstven konc. HCl. Směs byla ponechána 3 dny pod septem a vyloučená sraženina byla odfiltrována přes fritu S3 a produkt vysušen *in vacuo* nad P₂O₅. Celkem bylo připraveno 1,29 g látky **11**·4HCl·1,7H₂O, což odpovídá 72 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

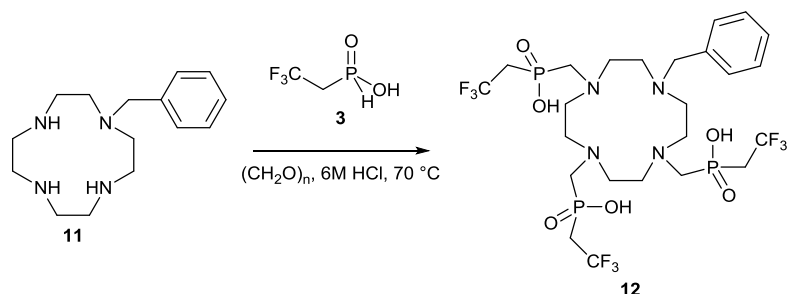
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 3,13 (4H, m, NCH₂CH₂NBnCH₂CH₂N; 3,20 (8H, m, NCH₂CH₂NCH₂CH₂N); 3,27 (4H, b, NCH₂CH₂NBnCH₂CH₂N); 4,05 (2H, s, NCH₂Ph); 7,48 (5H, m, *fenyl*)

¹³C NMR (150,9 MHz, D₂O): δ 42,19 (4C, m, NCH₂CH₂NCH₂CH₂N); 43,82 (2C, t, *J*_{CH} = 23,4, NCH₂CH₂NBnCH₂CH₂N); 48,56 (2C, t, NCH₂CH₂NBnCH₂CH₂N, *J*_{CH} = 18,8); 57,62 (2C, t, NCH₂Ph, ¹*J*_{CH} = 49,0); 129,01 (2C, t, *fenyl*, ¹*J*_{CH} = 31,5); 130,36 (2C, d, *fenyl*, *J*_{CH} = 29,6); 133,29 (1C, s, kvartérní uhlík *fenyl*)

MS-ESI: (+): 263,0 ([M+H]⁺, teor. 262,2)

Elementární analýza: C: 41,17 %; H: 7,80 %; N: 12,25 %; Cl: 32,85 % (teoreticky **11**·4HCl·1,7H₂O = C₁₅H_{33,4}Cl₄N₄O_{1,7} odpovídá C: 41,11 %; H: 7,67 %; N: 12,78 %; Cl: 32,36 %)

3.3.4 Příprava *N*-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny] (DO3P^{tfc}Bn)

Schéma 3.4: Příprava DO3P^{tfc}Bn

Do 50 mL baňky bylo naváženo 0,5 g (1,14 mmol) látky **11**·4HCl·1,7H₂O a k tomu přidán roztok látky **3** vzniklý smísením 25 mL 6M HCl a 2,4 g látky **3** (16 mmol, 14 ekv.). Do reakční směsi bylo přidáno 0,2 g paraformaldehydu (7 mmol, 6 ekv.) a ponecháno reagovat bez přístupu vzduchu 5 dní při teplotě 70 °C. Směs byla odpařena do sucha na RVO, rozpuštěna v malém množství vody a přečištěna sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, 3,5×35 cm, eluce vodou). Frakce obsahující produkt byly smíseny a odpařeny do sucha na RVO. Bylo připraveno celkem 1,0 g látky **12**·1,5HCl·5H₂O, což odpovídá 95 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

TLC: MeOH, $R_f = 0,50$, detekce CuSO₄, 10% vodný roztok

¹H NMR (299,941 MHz, D₂O): δ 2,78 (6H, m, CF₃CH₂P); 2,98 (4H, d, NCH₂P); 3,20 (2H, s, NCH₂P); 3,04–3,52 (10H, m, cyklus); 3,75 (6H, s, NCHHCH₂NBn); 4,68 (2H, s, NCH₂Ph); 7,57 (5H, m, arom.)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, D₂O): δ 35,06 (2C, dd, PCH₂CF₃, $J_{CP} = 83,8$, $J_{CF} = 28,4$); 36,73 (1C, dd, PCH₂CF₃, $J_{CP} = 91,6$, $J_{CF} = 28,2$); 49,86; 51,84; 52,36; 53,53 (cyklus); 50,27 (1C, s, NCH₂P); 52,36 (2C, s, CH₂N(Bn)CH₂); 52,93 (2C, s, NCH₂P); 57,86 (1C, s, NCH₂Ph); 124,78 (1C, dq, PCH₂CF₃, $J_{CF} = 275$, $J_{CP} = 3,02$); 124,86 (2C, dq, PCH₂CF₃, $J_{CF} = 275$, $J_{CP} = 1,51$); 127,43; 129,45; 130,38; 132,38 (5C, s, arom.)

³¹P NMR (121,422 MHz, D₂O): δ 17,62 (1P, m); 29,30 (2P, m)

¹⁹F NMR (282,187 MHz, D₂O): δ -61,14 (6F, m); -61,40 (3F, m)

MS-ESI: (+): 743,5 ($[M+H]^+$, teor. 743,2); 765,5 ($[M+Na]^+$, teor. 765,2); 781,4 ($[M+K]^+$, teor. 781,2)

MS-ESI: (-): 741,3 ($[M-H]^-$, teor. 741,2); 778,6 ($[M-2H+K]^-$, teor. 779,1)

Elementární analýza: C: 34,76 %; H: 5,41 %; N: 6,29 %; F: 17,39 %; Cl: 6,45 %; P: 10,46 % (teoreticky $8 \cdot 1,5HCl \cdot 4,5H_2O = C_{24}H_{48,5}Cl_{1,5}F_9N_4O_{11}P_3$ odpovídá C: 32,49 %; H: 5,62 %; N: 6,31 %; F: 19,27 %; Cl: 19,06 %; P: 10,47 %)

3.3.5 Příprava 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny] (DO3P^{tfe})

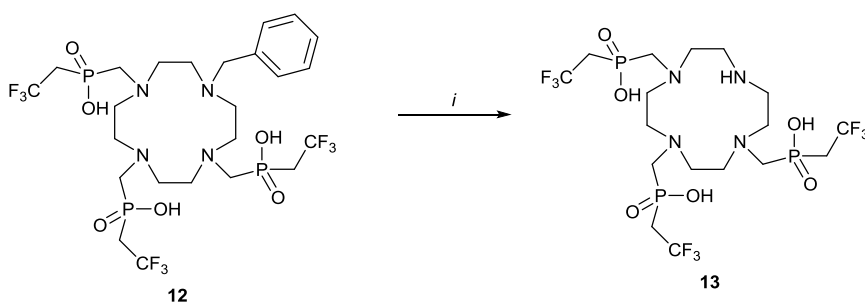


Schéma 3.5: Příprava DO3P^{tfe}

Tabulka 3.1: Reakční podmínky přípravy DO3P^{tfe}

| Metoda | <i>i</i> |
|--------|--|
| A | Pd/C, H ₂ ; H ₂ O |
| B | Pd/C, HCOO(NH ₄); MeOH |
| C | Pd/C, H ₂ ; 50% AcOH |
| D | CCl ₃ CH ₂ OCOCl; MeCN (dry) |
| E | Pd/C, proud H ₂ ; H ₂ O |

Metoda A

150 mg (0,20 mmol) látky **12**·1,5HCl·5H₂O bylo rozpuštěno v 20 mL vody v 50mL hruškovité baňce. V roztoku bylo suspendováno 42 mg (30 hm. %) Pd/C. Baňka byla sekurována a poté opatřena balonkem s vodíkem. Směs byla ponechána reagovat 3 dny při 40 °C, poté byla zkontrolována TLC a MS; bylo zjištěno, že reakce neproběhla.

Metoda B

Ve 4mL vialce byl připraven roztok vzniklý rozpuštěním 26 mg (0,04 mmol) látky **12**·1,5HCl·5H₂O v 2 mL MeOH. K tomu bylo přidáno 66,2 mg (1,05 mmol, 26 ekv.) mravenčanu amonného a 3 mg (10 hm %) Pd/C. Směs byla ponechána za stálého míchání reagovat při 60 °C. Po 3 h bylo do reakce přidáno 43 mg (0,68 mmol, 17 ekv.) mravenčanu amonného a 3 mg (10 hm. %) Pd/C. Po dalších 2 h byla směs zkontrolována TLC a MS; bylo zjištěno, že reakce neproběhla.

Metoda C

V 50mL hruškovité baňce bylo rozpuštěno 150 mg (0,20 mmol) látky **12**·1,5HCl·5H₂O v 20 mL 50% AcOH. Poté bylo do roztoku přidáno 30 mg (20 hm. %) Pd/C. Baňka byla sekurována a opatřena balonkem s vodíkem. Směs byla ponechána reagovat při 60 °C po dobu 3 dní, poté byla kontrola TLC a MS. Bylo zjištěno, že hydrogenace neproběhla.

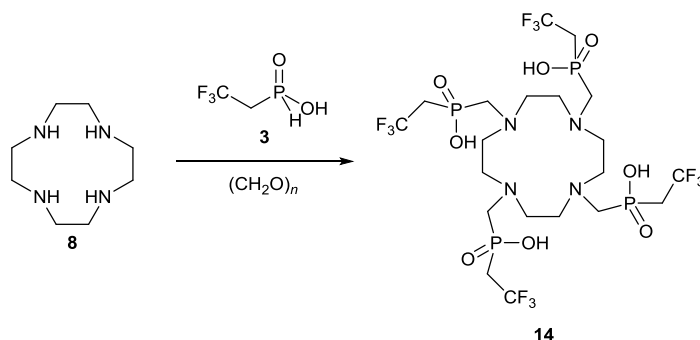
Metoda D

26,3 mg (0,04 mmol) látky **12**·1,5HCl·5H₂O bylo rozpuštěno v 1 mL suchého MeCN a přidáno 20 µL trichlorethyl-chloroformiátu (cca 4 ekv.) a necháno míchat při RT přes noc (cca 12 h). Poté byla reakční směs odpařena do sucha na RVO a zkontrolována na MS a NMR. Bylo zjištěno, že záměna benzylové chránicí skupiny za 2,2,2-trichlorethylkarbamátovou skupinu neproběhla.

Metoda E

Do 25mL slzové baňky bylo naváženo 27,3 mg (24 hm. %) Pd/C. Baňka byla opatřena míchadlem a septem a promyta malým množstvím argonu. Poté byly přidány 4 mL destilované vody a suspenze byla probublávána vodíkem asi 15 minut. Následně byl přidán roztok látky **12** vzniklý rozpuštěním 116 mg (0,16 mmol) látky **12**·1,5HCl·5H₂O v 5 mL destilované vody. Směs byla nechána reagovat za laboratorní teploty za stálého míchání a mírného probublávání vodíkem.

Po 6 dnech byla reakce ukončena a směs zkontrolována TLC, NMR a MS. Integrací ¹H NMR spektra bylo zjištěno, že reakce proběhla z 50 % a byla získána směs látek **12** a **13**. Charakterizace NMR není uvedena z důvodu překryvu signálů látek **12** a **13**.

Charakterizace:TLC: MeOH, $R_f = 0,75$, detekce CuSO_4 , 10% vodný roztokMS-ESI: (+): 653,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$; 653,15)**3.3.6 Příprava 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny] (DOTP^{tfe})**Schéma 3.6: Příprava DOTP^{tfe}Tabulka 3.2: Reakční podmínky přípravy DOTP^{tfe}

| Experiment | <i>i</i> |
|------------|----------|
| 1 | 3M HCl |
| 2 | 6M HCl |
| 3 | 50% TFA |
| 4 | 100% TFA |

Čerstvě přečištěná 2,2,2-trifluorethylfosfinová kyselina (**3**) byla rozdělena do čtyř 50mL baněk rovným dílem (celkem bylo připraveno přibližně 4 g látky **3**). Do každé baňky bylo přidáno 45 mL vybraného rozpouštědla (dle tabulky 3.2), malé množství cyklenu (cca 20–40 mg) a paraformaldehydu. Baňky byly uzavřeny skleněnou zátkou, které byly zajištěny svorkou. Reakční směsi byly umístěny do lázně a nechány reagovat při 60 °C. Směsi byly ponechány reagovat 2 dny, poté byla provedena kontrola ³¹P NMR. Opět bylo přidáno do každé baňky malé množství cyklenu a paraformaldehydu. Takto bylo postupováno, dokud vznikl chtěný produkt. Celkem reakce probíhala 10 dní.

Poté byla každá reakční směs odpařena do sucha a rozpuštěna v minimálním množství vody. Následně byla směs přečištěna na kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ cyklus, 3×40 cm). Produkt byl eluován vodou, byly jímány frakce po 50 mL. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny do sucha na RVO při teplotě $70^\circ C$. Byl pozorován vznik pevného I_2 . Odparek byl rozpuštěn v 20 mL vody a extrahován 4×50 mL $CHCl_3$. Vodná fáze byla poté odpařena zcela do sucha na RVO a převrstvena suchým THF a ponechána 2 dny stát. Vzniklá bílá sraženina byla odsáta na fritě S4 a produkt vysušen *in vacuo* na P_2O_5 . Použitá množství cyklenu, množství připraveného produktu **14** a výtěžek reakcí je uveden v tabulce 3.3.

Výsledky elementární analýzy jsou diskutovány v kap. 4.2.

Tabulka 3.3: Navážky cyklenu a výtěžek reakcí přípravy DOTP^{tf}

| Rozpouštědlo | Navážka cyklenu (8) | Získaný produkt (14) | Výtěžek |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| 3M HCl | 127 mg | 168 mg | 30 % |
| 6M HCl | 90 mg | 376 mg | 88 % |
| 50% TFA | 247 mg | — ^a | — |
| 100% TFA | 245 mg | — ^a | — |

^a – produkt nebyl v reakční směsi přítomen, došlo k dezinterpretaci NMR spekter, diskutováno v kap. 4.2

Charakterizace:

TLC: IPAV 7:3:3, $R_f = 0,95$, detekce $CuSO_4$, 10% vodný roztok

1H NMR (299,9 MHz, D_2O): δ 2,74 (8H, p, $^2J_{HP} = ^3J_{HF} = 12,0$ Hz, PCH_2CF_3); 3,33 (8H, s, PCH_2N); 3,45 (16H, s, NCH_2CH_2N)

$^{13}C\{^1H\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): δ 35,27 (4C, d, $^1J_{CP} = 58,9$ Hz, PCH_2CF_3); 51,14 (8C, s, NCH_2CH_2N); 52,58 (4C, d, $^1J_{CP} = 101$ Hz, NCH_2P); 125,2 (4C, q, $^1J_{CF} = 275$ Hz CH_2CF_3)

^{31}P NMR (121,4 MHz, D_2O): δ 21,8 (4P, br)

^{19}F NMR (282,2 MHz, D_2O): δ -58,06 (12F, m)

MS-ESI: (–): 832,6 ($[M-2H+Na]^+$, teor. 833,1); 848,6 ($[M-2H+K]^+$, teor. 849,5)

Elementární analýza: C: 29,50 %; H: 5,67 %; N: 6,69 %; F: 19,26 %; Cl: 6,75 %; P: 11,77 %

3.3.7 Příprava 1,8-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]cyklamu

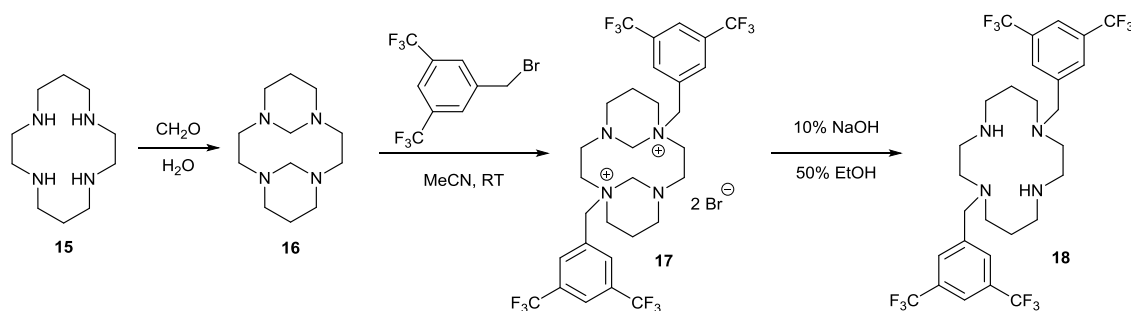


Schéma 3.7: Příprava 1,8-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]cyklamu

Do 500mL baňky bylo naváženo 5,0 g cyklamu (**15**; 24,96 mmol) a přidáno 300 mL vody. Směs byla za stálého míchání vychlazena lázní voda-led-sůl. Poté bylo přikapáno celkem 5,5 mL 36% roztoku formaldehydu a ponecháno přes noc ohřát na laboratorní teplotu. Druhý den byla sraženina odfiltrována na fritě S3, matečný louh zahuštěn na RVO a získaná sraženina znovu zfiltrována. Připravený produkt byl vysušen *in vacuo* nad P_2O_5 . Celkem bylo připraveno 6,9 g látky **16**. Z důvodu dobrých zkušeností s tímto postupem nebyla látka **16** charakterizována.[37]

Do 100mL baňky bylo naváženo 1,5 g látky **16** a ponecháno několik hodin se sušicí rourkou dehydratovat při 120 °C. Získaný olej byl rozpuštěn v 30 mL suchého MeCN. Mezitím byl připraven roztok alkylačního činidla smísením 5,0 g bis(3,5-trifluormethyl)benzylbromidu s 10 mL suchého MeCN. Za stálého míchání byl roztok alkylačního činidla přikapán k roztoku látky **16**. Po několika minutách byl pozorován vznik bílé sraženiny. Suspenze byla ponechána míchat do druhého dne, kdy byla odfiltrována na fritě S3. Sraženina byla promyta malým množstvím suchého MeCN a následně vysušena *in vacuo* nad P_2O_5 . Celkem bylo připraveno 5,2 g látky **17**, což odpovídá 92 % teoretického výtěžku.

NMR charakterizace není uvedena z důvodu extrémně nízké rozpustnosti produktu (zkoušeno ve vodě, EtOH, MeOH, $CHCl_3$ a DCM)

Charakterizace:

Elementární analýza: C: 42,75 %; H: 4,01 %; N: 6,37 %; F: 26,20 %; Br: 21,87 % (teoreticky **17** = $C_{30}H_{34}Br_2F_{12}N_4$ odpovídá C: 42,98 %; H: 4,09 %; N: 6,68 %; F: 27,19 %; Br: 19,06 %)

Do 100mL baňky bylo naváženo 2,7 g látky **17** a zalito 70 mL 10% NaOH v 50% EtOH. Ponecháno při laboratorní teplotě míchat 5 dní.

Směs byla následně extrahována 3×100 mL DCM. Organické fáze byly spojeny a odpařeny do sucha na RVO. Získaný olej byl rozpuštěn asi v 0,5 mL vody a roztok převrstven asi 30 mL konc. HCl. Druhý den byla odfiltrována bílá sraženina na fritě S3, promyta malým množstvím Et₂O a ponechána sušit *in vacuo*. Celkem bylo připraveno 2,44 g látky **18**·4HCl·H₂O, což odpovídá 92 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

TLC: MeOH, $R_f = 0,10$, detekce CuSO₄, 10% vodný roztok

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 1,89 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N); 2,58 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N-Ar); 2,67 (4H, s, RNCH₂CH₂N); 2,72 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂NR); 2,81 (4H, s, RNCH₂CH₂N); 3,67 (4H, s, NCH₂-Ar); 7,80 (4H, s, arom.-*ortho*); 7,69 (2H, s, arom.-*para*)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, CDCl₃): δ 25,66 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂N); 47,36 (2C, s, RNCH₂CH₂N); 48,29 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂NR); 50,78 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂NR); 53,59 (2C, s, RNCH₂CH₂N); 57,21 (2C, s, NCH₂-Ar); 121,04 (2C, s, arom.-*para*); 128,66 (4C, s, arom.-*ortho*); 131,70 (4C, q, Ar-CF₃; ¹J_{CF} = 33,1); 142,27 (2C, kvartérní uhlík fenyl)

¹⁹F NMR (282,2 MHz, D₂O): δ -63,10 (12F, dd, ⁴J_{FH} = 5,8; ⁴J_{FH} = 3,6)

MS-ESI: (+):653,0 ([M+H]⁺; teor. 653,3)

MS-ESI: (-):651,3 ([M-H]⁻; teor. 651,3)

Elementární analýza: C: 41,40 %; H: 4,72 %; N: 6,63 %; F: 25,79 %; Cl: 18,20 % (teoreticky **18**·4HCl·H₂O = C₂₈H₃₈F₁₂N₄Cl₄O odpovídá C: 41,19 %; H: 4,69 %; N: 6,86 %; F: 27,92 %; Cl: 17,37 %)

3.3.8 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfinové) kyseliny

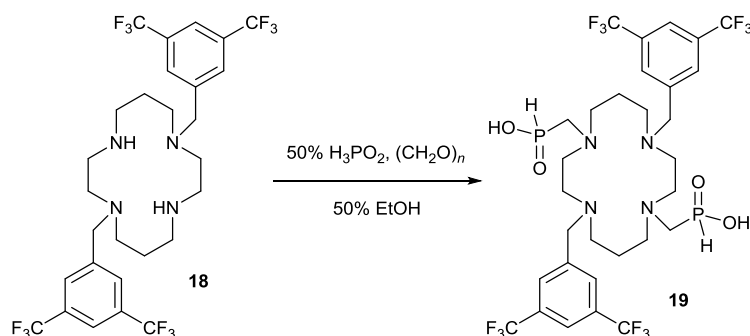
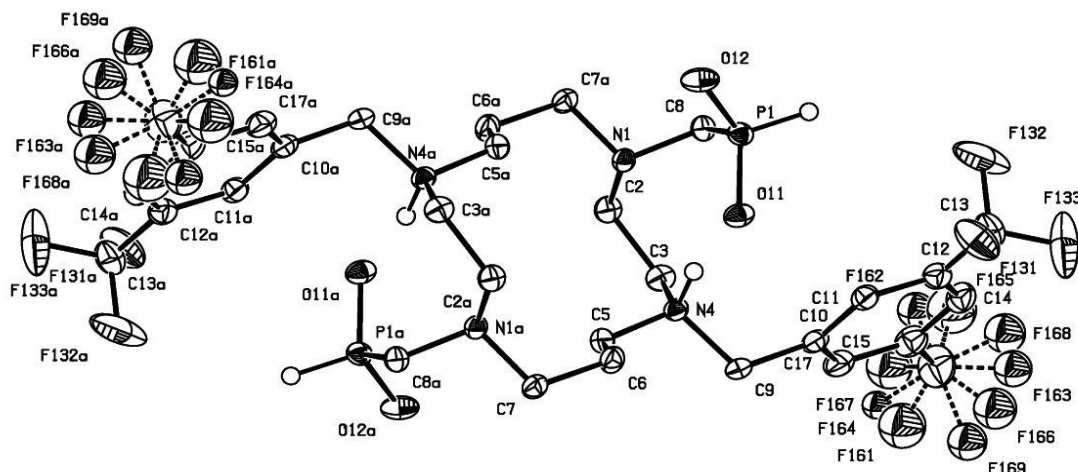


Schéma 3.9: Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfinové) kyseliny

1,5 g (1,84 mmol) látky **18**·4HCl·H₂O bylo suspendováno v 150 mL 5% NaOH a extrahováno 3× 100 mL CHCl₃. Organické fáze byly spojeny a odpařeny v 100mL baňce. 1,0 g látky **18** ve formě volného aminu bylo naváženo do 100 mL slzovité baňky a přidány 4 mL 50% roztoku H₃PO₂ a 2,5 g paraformaldehydu. Suspenze byla zalita 60 mL 50% EtOH, baňka byla opatřena zábrusovým zátkou jištěnou svorkou a směs byla ponechána reagovat při 40 °C. Po 3 dnech byla reakční směs přečištěna chromatografií na silném katexu (Dowex 50, 50–100 mesh, 3,5×35 cm), nečistoty byly eluovány vodou, produkt byl eluován 400 mL 10% roztoku pyridinu a následně 50% MeOH do čistého eluátu (kontrola ³¹P NMR). Roztok byl odpařen na RVO při 45 °C a překrystalován z methanolu. Krystalický produkt byl poté odsát na fritě S3 a promyt malým množstvím studené vody. Bylo získáno 1,4 g látky **19**·4H₂O, což činí 80 % teoretického výtěžku. Produkt byl také charakterizován RTG strukturní analýzou monokrystalu.



Obr 3.1: Krystalová struktura 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfinové) kyseliny

Charakterizace:

TLC: MeOH, $R_f = 0,65$, detekce CuSO_4 , 10% vodný roztok

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 2,12; 2,23 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N); 2,42 (4H, s, NCH₂CH₂NP); 2,49 (4H, s, NCH₂P); 2,72; 2,99 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N-Bn); 3,07; 3,25 (4H, s, NCH₂CH₂NP); 4,33; 4,77 (4H, s, NCH₂-Ar); 6,97 (2H, d, P-H, ¹J_{HP} = 502); 8,13 (2H, s, arom.-*para*); 8,34 (4H, s, arom.-*ortho*)

¹³C NMR (150,9 MHz, CD₃OD): δ 24,13 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂N); 49,69 (2C, s, NCH₂CH₂NP); 51,45 (2C, s, PNCH₂CH₂CH₂N); 51,86 (2C, s, NCH₂CH₂NP); 55,62 (2C, d, NCH₂P, *J*_{CP} = 108); 57,45 (2C, s, NCH₂–Ar); 58,14 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂N–Bn); 125,39 (2C, s, arom.-*para*); 125,42 (4C, q, arom.–CF₃, ¹*J*_{CF} = 272); 132,13 (m, kvartérní uhlík arom.)

³¹P NMR (121,4 MHz, D₂O): δ 19,07 (2P, d, ¹J_{PH} = 502) ^{19}F NMR (282,2 MHz, CD_3OD): δ -64,29 (12F, s)MS-ESI: (+): 831,5 ($[M+Na]^+$; 831,2)MS-ESI: (-): 807,3 ($[M-H]^-$; 807,2)

Elementární analýza: C: 41,2 %; H: 5,3 %; N: 6,3 %; F: 24,0 %; P: 7,3 % (teoreticky $19 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{F}_{12}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}_2$ odpovídá C: 40,9 %; H: 5,2 %; N: 6,4 %; F: 25,9 %; P: 7,0 %)

RTG: C₃₀H₄₂F₁₂N₄O₆P₂, $M_r = 844,62$, soustava monoklinická, $a = 15,1146(3) \text{ \AA}$, $b = 8,8460(2) \text{ \AA}$, $c = 14,1391(3) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 103,4103(8)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $U = 1838,91(7) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, prostorová grupa P 2₁/c, $R_1 = 0,0589$, w $R_2 = 0,1440$

3.3.9 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis[methyl(hydroxomethyl)fosfinové] kyseliny

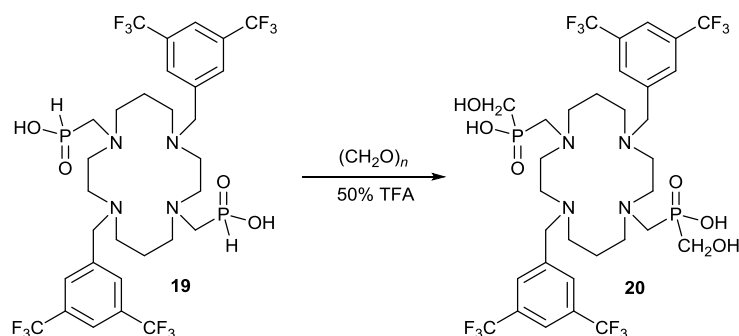


Schéma 3.12: Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis[methyl(hydroxomethyl)fosfinové] kyseliny

50 mg (0,06 mmol) látky **19**·4H₂O bylo naváženo do 4mL vialky opatřené míchadlem. Látka **20** byla rozpuštěna ve 3 mL 50% TFA a bylo přidáno 45 mg (1,5 mmol, 25 ekv.) paraformaldehydu. Reakční směs byla ponechána reagovat při 60 °C. Po 4 dnech byla provedena kontrola ³¹P NMR. Do reakční směsi bylo přidáno dalších 45 mg (1,5 mmol, 25 ekv.) paraformaldehydu a reakční teplota zvýšena na 80 °C. Směs byla nechána reagovat další 4 dny a po další kontrole ³¹P NMR ukončena. Roztok byl odpařen do sucha na RVO. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (15 g SiO₂, MeOH, *R_f*(**20**) = 0,55). Frakce obsahující produkt **20** byly ponechány volně odpařovat. Bylo získáno 40 mg látky **20**.

Charakterizace:

TLC: MeOH, *R_f* = 0,55, detekce CuSO₄, 10% vodný roztok

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 1,74 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N); 2,50; 2,59; 2,67; 2,72 (16H, s, CH₂ skupiny cyklu); 3,56 (4H, d, NCH₂P, ²*J*_{HP} = 6); 3,47 (4H, NCH₂–Ar)

³¹P NMR (121,4 MHz, D₂O): δ 34,16 (2P, s)

¹⁹F NMR (282,2 MHz, D₂O): δ –62,97 (12F, s)

MS-ESI: (+): 869,5 ([M+H]⁺; teor. 869,3)

MS-ESI: (–): 867,3 ([M–H][–]; teor. 867,2)

3.3.10 Příprava tetraethylesteru 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

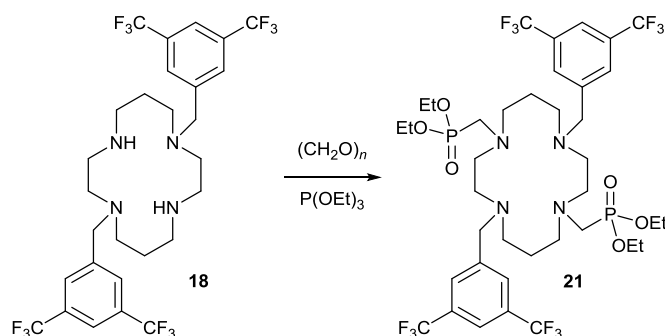
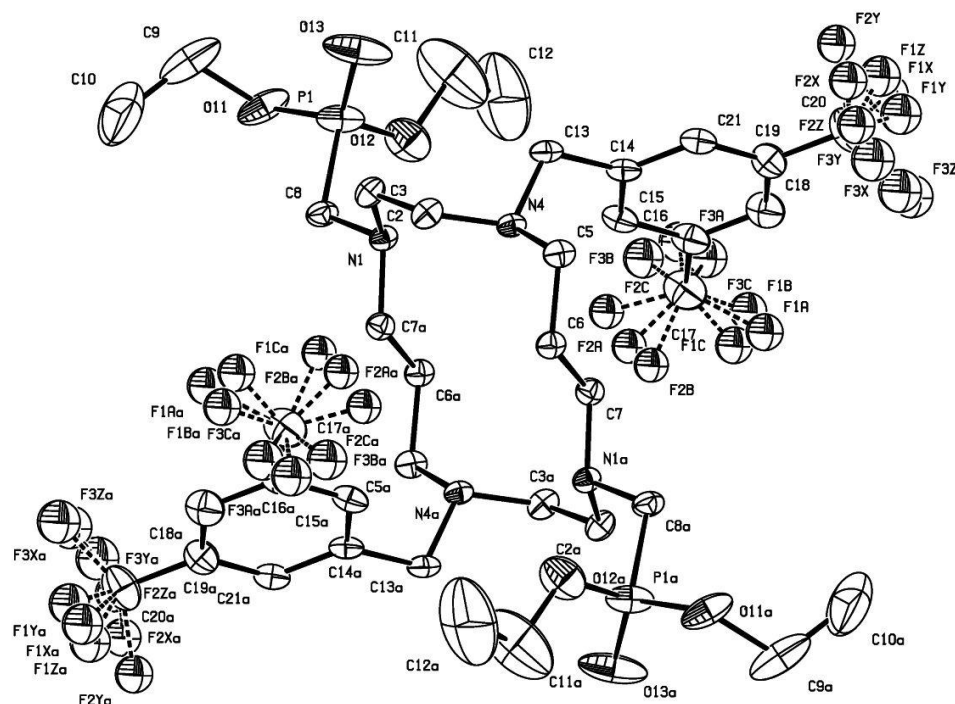


Schéma 3.8: Příprava tetraethylesteru 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

1,0 g látky **18**·4HCl·H₂O (1,22 mmol) bylo suspendováno v 150 mL 5% NaOH a extrahováno 3×100 mL CHCl₃. Organické fáze byly spojeny a odpařeny v 100 mL baňce. Do baňky bylo přidáno 0,5 g paraformaldehydu a 80 mL P(OEt)₃. Reakční směs byla ponechána reagovat 3 dny při 70 °C. Roztok byl následně nanesen na silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺ cyklus, 3,5×30 cm). Kolona byla promyta zhruba 1,5 L EtOH a produkt byl eluován 500 mL směsí EtOH:NH₃ 5:1. Eluát byl zahuštěn na RVO a produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (30,0 g SiO₂, MeOH, $R_f(\mathbf{21}) = 0,8$). Frakce obsahující produkt byly odpařeny a olej převrstven Et₂O. Po několika dnech byla objevena pevná fáze, která byla odfiltrována na fritě S1 a filtrát ponechán volně krystalovat. Celkem bylo připraveno 0,9 g látky **21**, což odpovídá 78 % teoretického výtěžku. Produkt byl také charakterizován RTG strukturní analýzou monokrystalu.



Obr. 3.2: Krystalová struktura tetraethylesteru 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

Charakterizace:

TLC: MeOH, $R_f = 0,90$, detekce CuSO_4 , 10% vodný roztok

¹H NMR (299,9 MHz, CD₃OD) δ 1,16 (12H, t, POCH₂CH₃, ³J_{HH} = 7,1); 1,77 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N); 2,39 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂NP); 2,49 (4H, s, NCH₂CH₂CH₂N-Bn); 2,78 (4H, s, NCH₂CH₂NP); 2,82 (4H, d, NCH₂P, ²J_{HP} = 10,3); 2,91 (4H, s, NCH₂CH₂NP); 3,76 (4H, s, NCH₂-Ar); 3,94 (8H, m, POCH₂CH₃); 8,13 (2H, s, arom.-*para*); 8,34 (4H, s, arom.-*ortho*)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, CD₃OD): δ 17,46 (2C, d, POCH₂CH₃, ¹J_{CP} = 5,8); 27,24 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂N); 51,08 (2C, s, NCH₂CH₂NP); 51,25 (2C, s, NCH₂CH₂NP); 52,16 (2C, s, NCH₂CH₂CH₂N–Bn); 54,27 (2C, s, PNCH₂CH₂CH₂N); 53,41 (2C, d, NCH₂P, ¹J_{CP} = 14,6); 57,83 (2C, s, NCH₂–Ar); 64,06 (2C, d, POCH₂CH₃, ²J_{CP} = 7,1); 122,32 (2C, s, arom.-*para*); 125,97 (4C, q, arom.–CF₃, ¹J_{CF} = 272); 133,09 (4C, q, kvartérní uhlík C–CF₃, ²J_{CF} = 33); 147,01 (2C, s, kvartérní uhlík arom.)

 ^{31}P NMR (121,4 MHz, CD_3OD : δ 26,48 (2P, m)) ^{19}F NMR (282,2 MHz, CD_3OD): δ -64,00 (12F, s)MS-ESI: (+): 953,0 ($[M+H]^+$, teor. 953,2)

MS-ESI: (-): 922,8 ($[M-Et]^-$, teor. 923,3)

Elementární analýza: C: 38,58 %; H: 4,24 %; N: 4,08 %; F: 27,23 %; P: 4,6 %
(teoreticky **21** = $C_{38}H_{54}F_{12}N_4O_6P_2$ odpovídá C: 47,9 %; H: 5,17 %; N: 5,88 %;
F: 23,93 %; P: 6,5 %; diskutováno v kap. 4.9)

RTG: $C_{38}H_{54}F_{12}N_4O_6P_2$, $M_r = 952,79$, soustava monoklinická, $a = 10,2676(5) \text{ \AA}$,
 $b = 10,5397(6) \text{ \AA}$, $c = 21,9838(12) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 102,9333(18)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$,
 $U = 2318,7(2) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, prostorová grupa P 2/c, $R_1 = 0,0954$, $wR_2 = 0,2249$

3.3.11 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

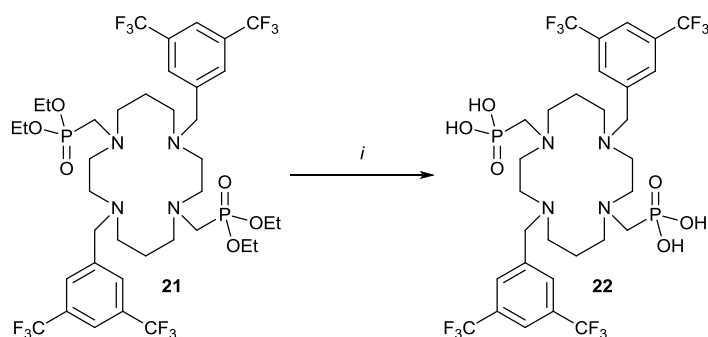


Schéma 3.10: Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

Tabulka 3.4: Reakční podmínky přípravy látky **22**

| Metoda | <i>i</i> |
|--------|---|
| A | 1. TMSBr, MeCN (dry) 2. H ₂ O |
| B | LiOH, H ₂ O:MeOH |
| C | 6M HCl, reflux |

Metoda A

Do 50mL baňky bylo naváženo 110 mg (0,12 mmol) látky **21**, která byla následně několikrát do sucha odpařena ze suchého MeCN. Poté byla rozpuštěna v 10 mL suchého MeCN a baňka byla obalena alobalem. Za stálého míchání byl přikapán roztok 0,4 mL (3,0 mmol, 25 ekv.) TMSBr v 2 mL suchého MeCN. Reakční směs byla při RT ponechána míchat přes noc. Druhý den byla směs odpařena na RVO

do sucha a rozpuštěna v malém množství suchého MeCN. Tento roztok byl nakapán do 250mL baňky obsahující 25 mL vody. Vzniklý roztok byl opařen do sucha a následně znovu odpařen z MeOH. Kontrolou MS a NMR bylo zjištěno, že reakce neproběhla a získaný roztok obsahuje pouze výchozí látku **21**.

Metoda B

Do 50 mL baňky bylo naváženo 110 mg (0,12 mmol) látky **21**, ke které bylo přidáno právě takové množství MeOH, aby došlo k rozpuštění látky **21**. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 mL nasyceného roztoku LiOH. Reakční směs byla ponechána při RT míchat 2 týdny. Směs byla odpařena do sucha a k odparku přidáno asi 30 mL MeOH. Kapalná fáze byla odsáta kapátkem do čisté baňky. Obě získané fáze byly podrobeny kontrole na MS a NMR. Bylo zjištěno, že reakce neproběhla a obě fáze obsahují pouze výchozí látku **21**.

Metoda C

Do 50mL baňky bylo naváženo 50 mg (0,05 mmol) látky **21** a přidáno 30 mL 6M HCl. Směs byla ponechána zahřívat k refluxu po dobu jednoho týdne. Poté byla reakce ukončena a roztok odpařen do sucha na RVO. Byl odebrán vzorek na NMR a rozpuštěn v D₂O s přidavkem konc. NH₃ do rozpuštění sraženiny. V ³¹P NMR spektrech byl detekován nově vzniklý signál. MS spektra ukázala přítomnost diethylesteru látky **22**. Došlo tedy pouze k částečné hydrolýze látky **21**.

Charakterizace:

³¹P NMR (121,4 MHz, D₂O) δ 20,64 (2P, s)

¹⁹F NMR (282,2 MHz, D₂O) δ -62,68 (12F, s)

MS-ESI: (-): 895,5 ([M-H]⁻, teor. 895,7)

Látka **22** byla nakonec získána oxidací látky **19**.

Metoda D

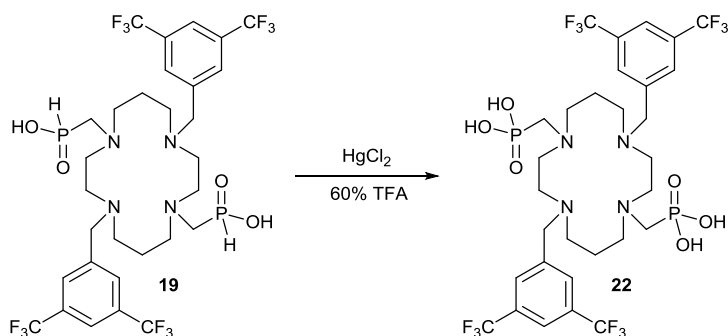


Schéma 3.11: Příprava 1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

640 mg (0,80 mmol) látky **19** bylo rozpuštěno v 100 mL 60% TFA a přidáno 1,1 g (4,0 mmol, 5 ekv.) HgCl_2 . Směs byla ponechána míchat 2 dny při RT. Poté byla suspenze odpařena do sucha a odparek přelit 200 mL směsí aceton:isopropanol 1:1. Pevný podíl byl odcentrifugován a filtrát probublán velkým množstvím H_2S . Byl pozorován zákal reakční směsi a typický thiolový zápach. Proto byla z reakční směsi oddestilována organická rozpouštědla (aparatura byla opatřena bublačkou se Savem[®] k likvidaci vzniklých thiolů) a destilační zbytek byl zalit 200 mL vody. Byla provedena kontrola reakční směsi TLC a MS, čímž byla potvrzena přítomnost produktu ve směsi. Po odfiltrování pevného HgS byl roztok zahuštěn na RVO. Produkt byl dočištěn chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (25 mL, Dowex 50, eluce $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:5). Bylo získáno 150 mg hnědého oleje.

Charakterizace:

^{31}P NMR (121,4 MHz, D_2O): δ 16,60 (2P, b)

^{19}F NMR (282,2 MHz, D_2O): δ -75,55 (12F, s)

MS-ESI: (+): 840,9 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 841,2)

3.3.12 Příprava komplexů $[\text{Ln}(\text{DOTP}^{\text{tfe}})]^-$

Do 4mL skleněné vialky bylo naváženo 50 mg (0,06 mmol) látky **14** a 1,5 ekv. (0,09 mmol) hexahydrátu chloridu Ln^{III} . Navážky byly rozpuštěny v 2 mL vody. Po rozpuštění navážek bylo upraveno pH pomocí 5% roztoku NaOH na pH okolo 5,5.

Za stálého míchání byl roztok zahříván po dobu 3 dnů, po celou dobu bylo udržování pH nad 5,5. Roztok byl následně odpařen do sucha na RVO. Komplex byl přečištěn na kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ cyklus, 1×3 cm), produkt byl eluován vodou. Eluát byl odpařen do sucha na RVO a rozpuštěn v 4 mL vody.

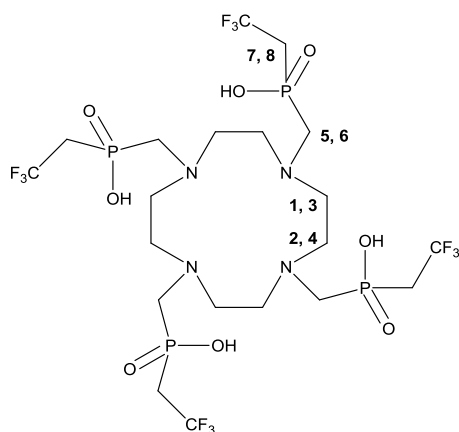
Koncentrace komplexů $[Ln^{III}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ byla stanovena Evansovou metodou BMS.[35]

Charakterizace:

Komplexy $[Ln^{III}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ již byly charakterizovány v bakalářské práci,[38] z důvodu nové syntézy byly přeměřeny znovu. Pro větší přehlednost jsou charakterizace uvedeny v tabulkách 3.5-7 (MS-ESI a NMR charakterizace). U charakterizace 1H NMR spekter byly také metodou LIS (Lanthanoid-Induced Shift – lanthanoidem indukovaný posun);[39] přiřazeny signály k jednotlivým atomům vodíku, toto přiřazení bylo provedeno Mgr. Jiřím Bártou.

Tabulka 3.5: Charakterizace komplexů $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ pomocí MS-ESI

| Ln^{III} | MS-ESI(-) |
|--------------------------|---------------------------------------|
| La^{III} | 946,6 ($[\text{M}]^-$, teor. 947,0) |
| Ce^{III} | 947,6 ($[\text{M}]^-$, teor. 948,0) |
| Pr^{III} | 948,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 949,0) |
| Nd^{III} | 949,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 950,0) |
| Sm^{III} | 959,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 960,0) |
| Eu^{III} | 960,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 961,0) |
| Gd^{III} | 965,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 966,0) |
| Tb^{III} | 966,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 967,0) |
| Dy^{III} | 971,6 ($[\text{M}]^-$, teor. 972,0) |
| Ho^{III} | 972,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 973,0) |
| Er^{III} | 973,8 ($[\text{M}]^-$, teor. 974,0) |
| Tm^{III} | 976,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 977,0) |
| Yb^{III} | 981,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 982,0) |
| Lu^{III} | 982,7 ($[\text{M}]^-$, teor. 983,0) |

Tabulka 3.6: Charakterizace komplexů $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ pomocí ^1H NMR při 25 °CObr. 3.2: Označení vodíkových atomů v molekule DOTP^{tfe}

| δ ^1H MRI (299,9 MHz, D ₂ O) | | | | | | | | |
|---|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Ln ^{III} | Označení vodíkových atomů | | | | | | | |
| | H ¹ | H ² | H ³ | H ⁴ | H ⁵ | H ⁶ | H ⁷ | H ⁸ |
| La ^{III} | 3,47 | 2,20 | 2,37 | 3,38 | 3,34 | 2,55 | 3,02 | 2,66 |
| Ce ^{III} | 7,83 | 0,28 | 1,34 | −10,26 | 12,40 | 6,25 | 6,17 | 3,90 |
| Pr ^{III} | 12,96 | 0,93 | −1,40 | −27,09 | 23,47 | 11,57 | 9,10 | 4,30 |
| Nd ^{III} | 8,78 | 6,16 | 6,06 | −11,43 | 13,10 | 9,29 | 4,03 | 3,67 |
| Sm ^{III} | 5,17 | 1,13 | 1,39 | −1,40 | 7,19 | 4,02 | 3,93 | 3,01 |
| Eu ^{III} | −8,70 | −1,73 | −3,21 | 23,76 | −10,12 | −5,60 | 3,12 | 0,45 |
| Gd ^{III} | — ^a | — ^a | — ^a | — ^a | — ^a | — ^a | — ^a | — ^a |
| Tb ^{III} | 168,00 | −99,89 | −92,59 | −415 | 334,19 | 117,48 | −6,12 | 58,40 |
| Dy ^{III} | 153,72 | −79,14 | −75,14 | −388,77 | 293,64 | 107,64 | −3,91 | 50,98 |
| Ho ^{III} | 77,65 | −38,17 | −35,41 | −182,37 | 142,15 | 51,17 | −0,50 | 24,88 |
| Er ^{III} | −82,80 | 39,58 | 24,30 | 234,02 | −161,10 | −70,46 | −16,34 | 16,14 |
| Tm ^{III} | −182,90 | 80,63 | 66,24 | 477,14 | −345,06 | −140,13 | −35,43 | 32,61 |
| Yb ^{III} | −31,42 | 17,33 | 12,97 | 91,18 | −59,03 | −24,86 | 8,00 | −3,69 |
| Lu ^{III} | 3,61 | 2,54 | 2,71 | 3,47 | 3,50 | 2,80 | 3,16 | 2,96 |

^a – u komplexu $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ nebyly pozorovány žádné signály

Tabulka 3.7: Charakterizace komplexů $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ pomocí ^{31}P NMR a ^{19}F NMR při 25 °C

| Ln^{III} | $\delta^{31}\text{P}$ NMR (121,4 MHz, D_2O) | $\delta^{19}\text{F}$ NMR (282,2 MHz, D_2O) |
|--------------------------|---|---|
| La^{III} | 30,52 (4P, s) | −54,77 (12F, m) |
| Ce^{III} | 22,34 (4P, s) | −56,45 (12F, m) |
| Pr^{III} | 19,33 (4P, s) | −54,98 (12F, m) |
| Nd^{III} | — ^a | −56,08 (12F, m) |
| Sm^{III} | 41,30 (4P, s) | −57,45 (12F, m) |
| Eu^{III} | 67,10 (4P, s) | −58,88 (12F, m) |
| Gd^{III} | 24,25 (4P, s) | −55,59 (12F, m) |
| Tb^{III} | — ^a | −39,41 (12F, m) |
| Dy^{III} | 407,31 (4P, s) | −41,00 (12F, m) |
| Ho^{III} | 205,54 (4P, s) | −49,54 (12F, m) |
| Er^{III} | −132,01 (4P, s) | −61,03 (12F, m) |
| Tm^{III} | −317,41 (4P, s) | −65,93 (12F, m) |
| Yb^{III} | −37,50 (4P, s) | −58,80 (12F, m) |
| Lu^{III} | 34,21 (4P, s) | −57,75 (12F, m) |

^a – u těchto komplexů nebyl v ^{31}P NMR spektru naměřen žádný signál

4. Výsledky a diskuze

4.1 Příprava 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny a jejího ethylesteru

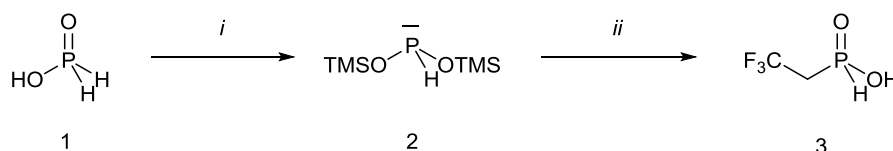


Schéma 4.1: Příprava kyseliny trifluorethylfosfinové

2,2,2-trifluorethylfosfinová kyselina (**3**) byla připravena dvojstupňovou syntézou (Schéma 4.1). Samotná syntéza již byla diskutována v bakalářské práci.[38] Oproti postupu popsane v bakalářské práci nebyl postup nikterak optimalizován. Výtěžky přípravy se pohybovaly okolo 25 – 40 %. Dle ^{31}P NMR je ovšem stupeň konverze okolo 60 – 80 %, v závislosti na suchosti rozpouštědel, kvalitě inertní atmosféry apod.

I přes mnohé pokusy o rozdělení produktu od kyseliny fosforové se nepodařilo najít žádnou metodu dělení těchto dvou látek.

Proto byla navržena syntéza ethylesteru 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny přes boranové chránění P–H vazby dle lit. [40] (Schéma 4.2). Bylo vycházeno z předpokladu, že produkt **6** bude touto cestou snáze čistitelný a izolován s větším výtěžkem.

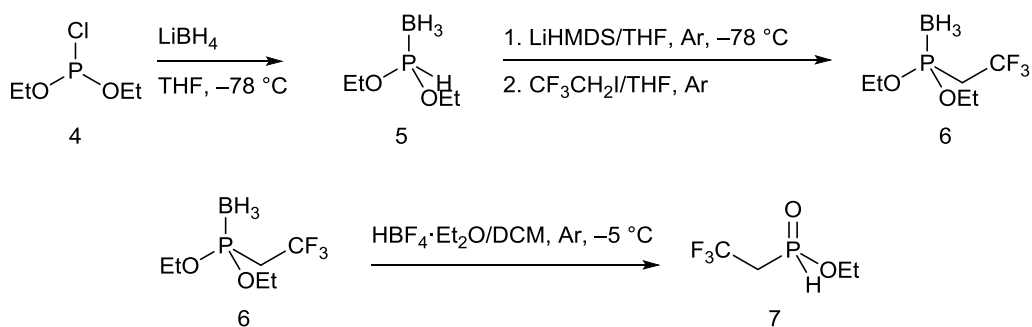


Schéma 4.2: Navržená příprava ethylesteru 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny

Navržená syntéza je čtyřstupňová. V prvním kroku je z diethoxychlorofosfinu připraven diethoxyfosfin-boranový komplex. Surový produkt **5** je přečištěn sloupcovou chromatografií na SiO₂. V dalším kroku je pomocí LiHMDS odtržen vodíkový kation, čímž vznikne aktivní částice, která má volný elektronový pár na atomu fosforu. Tato částice je v dalším kroku alkylována CF₃CH₂I. Dle ³¹P NMR byl stupeň konverze alkylace 90 %. V tomto kroku se ale nenašla žádná mobilní fáze, ve které by byla směs látek **5** a **6** dělitelná.

Postup, při kterém by se nejdříve odstranila boranová skupina a teprve potom by byl získán produkt **6**, byl zavržen z důvodu pravděpodobné nestability esterové skupiny. Byla by získána směs produktu **3** a kyseliny fosforité, která by se musela dělit obdobně jako při výše popsané syntéze. Produkt by byl sice připraven jinou cestou, ale proces čištění by nebyl zjednodušen a nebyla by zde ani časová úspora.

4.2 Příprava DO3P^{tfe}Bn a DOTP^{tfe}

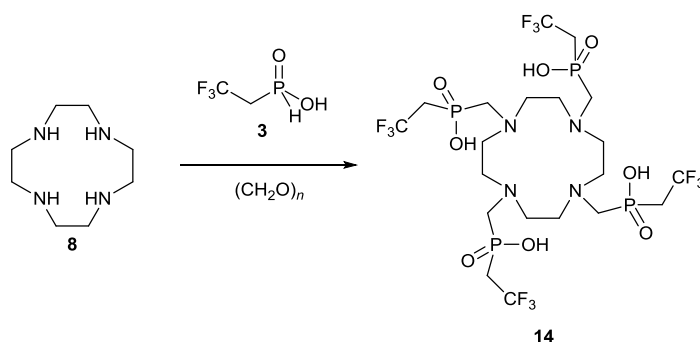


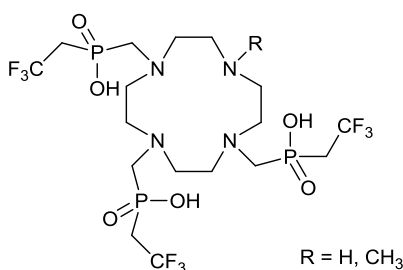
Schéma 4.3: Příprava DOTP^{tfe}

Tabulka 4.1: Reakční podmínky přípravy DOTP^{tfe}

| Experiment | <i>i</i> |
|------------|----------|
| 1 | 3M HCl |
| 2 | 6M HCl |
| 3 | 50% TFA |
| 4 | 100% TFA |

Ligand DOTP^{tfe} byl podobným postupem připraven již v bakalářské práci.[38] Rozdíl oproti dříve používanému postupu je v postupném přidávání cyklenu a

paraformaldehydu, zatímco dříve byly reaktanty naváženy a v jedné dávce přidány do reakční směsi po kontrole ^{31}P NMR. K tomuto postupu bylo přikročeno poté, co se nedařilo zreprodukovat postup uvedený v bakalářské práci; postup byl zopakován zhruba desetkrát a pokaždé ve výsledné reakční směsi namísto chtěného produktu **14** byl vedle vedlejších produktů reakce (hydroxomethyl-2,2,2-trifluorethylfosfinová kyselina, elementární jód) detekován pouze makrocyklus se 3 pendantními rameny (obr. 4.1), přičemž poslední dusíkový atom byl buď nesubstituovaný nebo namethylovaný.



Obr. 4.1: Vedlejší produkt přípravy DOTP^{tfe}

Během pokusů o reprodukci tohoto postupu byl vždy pozorován vznik elementárního jódu během reakce, který se generuje z jodidových aniontů přítomných v roztoku látky **3**, které nejsou kvantitativně odstranitelné.

Z tohoto důvodu bylo navrženo nové schéma syntézy, kdy se nejdříve připraví čistě ligand se třemi pendantními rameny, tedy ligand DO3P^{tfe}, který se poté nechá doreagovat na ligand DOTP^{tfe}. Vycházelo se z předpokladu, že optimalizace Mannichovy syntézy na jeden atom dusíku by měla být jednodušší nežli optimalizace současné reakce čtyř aminoskupin.

Proto byl dle lit. [40] připraven *N*-benzylcyklen postupem zobrazeným na schématu 4.4.

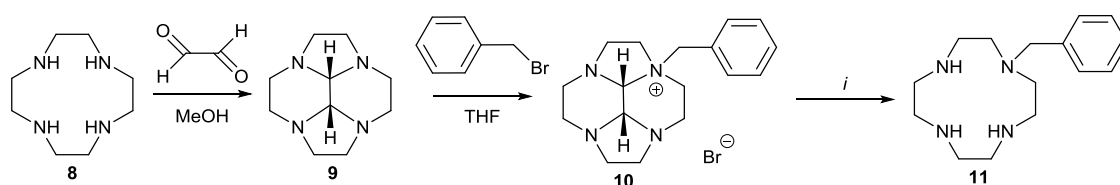


Schéma 4.4: Příprava *N*-benzylcyclenu

Syntéza je třístupňová. V prvním kroku přípravy je reakcí cyclenu s glyoxalem připraven *cis*-glyoxalcyklen a ten je následně alkylován benzylbromidem do prvního

stupně. Bromid kvartérní soli je v reakčním prostředí nerozpustný, výsledný produkt se pouze odfiltruje a vysuší.

Problematický je pouze krok, kdy dochází k odstranění glyoxalového můstku z produktu **10**. Prvně byl k tomuto kroku zvolen hydrazin dle lit. [40]. NMR spektra ukázala, že k odstranění můstku dochází, látka se zdála být NMR čistá. Elementární analýza produktu připraveného tímto postupem však ukázala silné znečištění chloridem hydrazinia, který nebyl v MS a NMR spektrech detekován. Proto bylo přikročeno k odstranění chránící skupiny za pomoci hydroxylaminu. Jeho 2M ethanolický roztok byl připraven dle lit. [34]. Elementární analýza ukázala, že produkt získaný tímto postupem je čistý, ve formě tetrahydrochloridu-hydrátu. S produktem **11** získaným postupem s hydrazinem nebylo dále pracováno.

Mannichova reakce kyseliny 2,2,2-trifluorethylfosfinové s připraveným *N*-benzylcyklenem byla provedena postupným přidáváním cyklu do reakční směsi za průběžné kontroly MS a ^{31}P NMR, dokud nedošlo ke zreagování více jak 90 % látky **3**. Tato reakce byla reprodukovatelná v malé škále (desítky mg) i velké škále (stovky mg až gram). V průběhu reakce nikdy nebyl pozorován vznik elementárního jódu.

Proto bylo po více jak roce přistoupeno ke zopakování přímé syntézy DOTP^{tfe} z cyklu, a to ve dvou reakčních prostředích – v 6M HCl a 50% TFA, s postupným přidáváním reaktantů k roztoku látky **3** (tyto experimenty nejsou popsány v kap. 3.3.6). Obě syntézy vedly ke kýženému produktu DOTP^{tfe}, navážky cyklu, hmotnost izolovaného produktu a výtěžek jsou uvedeny v Tabulce 4.2.

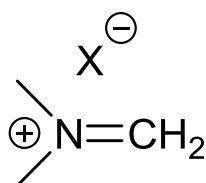
Tabulka 4.2: Navážky cyklu a výtěžek reakce první přípravy ligandu DOTP^{tfe}

| Reakční podmínky | Navážka cyklu | Hmotnost produktu | Výtěžek |
|------------------|---------------|-------------------|---------|
| 6M HCl | 188 mg | 310 mg | 35 % |
| 50% TFA | 161 mg | 417 mg | 55 % |

Tentokrát nebyl pozorován vznik elementárního jódu ani vedlejších produktů ($\text{DO3P}^{\text{tfe}}\text{R}$, kde $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3$). Všechny popsané úspěšné syntézy, jak $\text{DO3P}^{\text{tfe}}\text{Bn}$, tak DOTP^{tfe}, byly provedeny z nově koupeného cyklu (koupeno na podzim 2014 od firmy Chema-tech). Všechny předešlé pokusy o zreprodukování přímé syntézy DOTP^{tfe} byly reagovány s cyklenem z jiné šarže. Proto byla vyslovena domněnka, zda

původní cyklen neobsahoval nečistotu, která katalyzovala vznik elementárního jódu z přítomných jodidových aniontů, čímž byla znemožněna samotná Mannichova reakce, neb přítomný jód působil jako oxidační činidlo a oxidoval fosfinovou kyselinu na kyselinu 2,2,2-trifluorethylfosfonovou, která již Mannichově reakci nepodléhá. Další otázkou je, zda samotná nečistota nebránila i samotnému mechanismu Mannichovy reakce; příp. mohla podporovat metylaci cyklu (vedoucí k produktu $\text{DO3P}^{\text{tfe}}\text{Me}$). Tato domněnka se sice zdá být nepravděpodobná, poněvadž při výrobě cyklenu by se do směsi neměla dostat jakákoliv nečistota, která by mohla mít na tuto syntézu vliv.[41] Nicméně tuto domněnku není možné ani potvrdit, ani vyvrátit, protože dřívější šarže cyklenu je již spotřebována, takže nelze připravit experiment, při kterém by se nechaly reagovat dvě reakční směsi za stejných podmínek, které by se lišily pouze šarží cyklenu.*

Zajímavá je také domněnka, jak přítomnost elementárního jódu ovlivňuje průběh reakce. Pomineme-li schopnost oxidovat kyselinu fosfinovou na kyselinu fosfonovou, je zde ještě možnost, že vzniklý trijodidový anion I_3^- , který je vždy v rovnováze v roztoku, kde je elementární jód a jodidové anionty, interaguje s intermediátem makrocyklu; na obr. 4.2 je vyobrazena aktivní část intermediátu makrocyklu.



Obr. 4.2: Aktivní část intermediátu makrocyklu přítomného v reakci;
částice X^- značí anion kyseliny, ve které reakce probíhá

Trijodidový anion je snadno polarizovatelný a může tudíž nevazebně interagovat s dvojnou vazbou intermediátu a tím blokovat reakci, příp. podporovat metylaci cyklu. To by vysvětlilo i fakt, proč při některých pokusech byla v reakčních směsích i přes velké množství jódu v reakci pozorována stále přítomnost P–H vazby; nedocházelo tedy k její kvantitativní oxidaci. Mannichova reakce neprobíhá v roztoku kyseliny bromovodíkové, zda probíhá v kyselině jodovodíkové, nebylo zkoušeno.[41] Proto byla navržena série souběžných syntéz, kdy by se nechal cyklen reagovat pouze v prostředí

* pozn. paraformaldehyd byl použit stejný ze stejné láhve do všech reakcí v bakalářské i diplomové práci

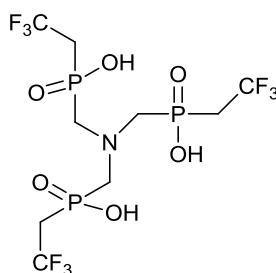
čisté kyseliny jodovodíkové, v čisté kyselině jodovodíkové s definovaným přídatkem jódu a za osvědčených reakčních podmínek; z výsledných reakčních směsí by se dalo zjistit, jaký vliv má přítomnost nadbytku jodidových a trijodidových aniontů na výsledek reakce. Experiment ovšem nebyl z časových důvodů proveden.

V kapitole 3.3.6 je popsána příprava DOTP^{tf} sérií 4 baněk, kdy byla použita 4 různá reakční prostředí, a to 3M HCl, 6M HCl, 50% TFA a 100% TFA. Zde byl předpoklad, že 6M HCl a 50% TFA budou mít obdobné výtěžky jako v dřívějších přípravách. U reakce v 6M HCl se tento předpoklad ukázal být správným. Výtěžky reakcí byly poprvé 35 %, podruhé 30 %, což je tolerovatelný rozdíl. Navážky cyklenu, hmotnost produktu a výtěžek reakce jsou uvedeny v tab. 4.3.

Tabulka 4.3: Navážky cyklenu a výtěžek reakcí přípravy DOTP^{tf}

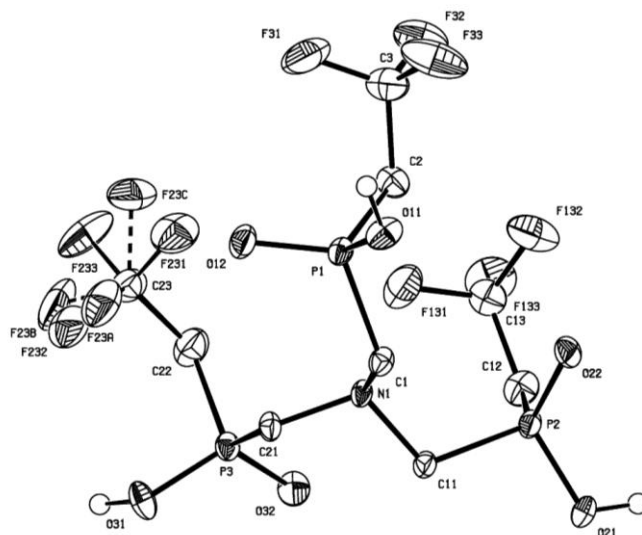
| Rozpouštědlo | Navážka cyklenu (8) | Získaný produkt (13) | Výtěžek |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| 3M HCl | 127 mg | 168 mg | 30 % |
| 6M HCl | 90 mg | 376 mg | 88 % |
| 50% TFA | 247 mg | — ^a | — |
| 100% TFA | 245 mg | — ^a | — |

U 50% TFA se ale již v průběhu čištění produktu dle spekter ukazovalo, že izolovaný výtěžek produktu nebude zdaleka tak vysoký, jako tomu bylo v prvním experimentu s tímto reakčním prostředím. Časem při čištění reakční směsi reagované ve 100% TFA bylo zjištěn i důvod, proč nakonec nebyl ze směsí reagovaných v 50% a 100% TFA izolován žádný produkt. V obou reakčních směsích byl totiž nalezen vedlejší produkt, který je zobrazen v obr. 4.3.



Obr. 4.3: Kyselina aminotris[methyl(2,2,2-trifluorethyl)fosfinová]

Jedná se o produkt Mannichovy reakce 2,2,2-trifluorethylfosfinové kyseliny se čpavkem, přičemž Mannichova reakce došla do 3. stupně. Tento produkt reakce byl potvrzen i RTG strukturní analýzou. Během NMR měření reakčních směsí (^{31}P i ^1H spekter) došlo ke špatné interpretaci, neb přítomnost signálů ukazující skupinu PCH_2N a $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{P}$ spolu se signálem CH_2 skupin makrocyklu byly mylně interpretovány, že ukazují na přítomnosti produktu DOTP^{tfe} . Namísto toho se jednalo o přítomnost více látek ve směsi – symetrické kyseliny aminotris[(methyl(2,2,2-trifluorethyl)fosfinové)], malého množství ligandu DOTP^{tfe} a zbylého makrocyklu. Na tuto chybu se přišlo v průběhu separace, kdy byla kyselina aminotris[(methyl(2,2,2-trifluorethyl)fosfinová)] izolována v krystalické podobě; krystalová strukturní analýza potvrdila strukturu tohoto produktu (Obr. 4.4).



Obr. 4.4: Krystalová struktura aminotris(methyl(2,2,2-trifluorethyl)fosfinové kyseliny (látko **23**)

Charakterizace:

^1H NMR (299,9 MHz, D_2O): 2,91 (6H, m, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{P}$); 3,76 (6H, d, NCH_2P , $^2J_{\text{HP}} = 8,4$)
 RTG: $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{F}_9\text{NO}_6\text{P}_3$, $M_r = 497,13$, soustava triklinická, $a = 8,9880(2)$ Å, $b = 9,1058(2)$ Å, $c = 13,0820(3)$ Å, $\alpha = 77,811(1)^\circ$, $\beta = 74,437(1)^\circ$, $\gamma = 61,391(1)^\circ$, $U = 901,15(3)$ Å³, $Z = 2$, prostorová grupa $P \bar{1}$, $R_1 = 0,0387$, $wR_2 = 0,0989$

Ze zbytku reakční směsi se již chtěný ligand DOTP^{tfe} nepodařilo izolovat. Látka **23** byla poté nalezena i v reakční směsi připravované v 50% TFA. Ani z této reakční směsi se chtěný produkt DOTP^{tfe} nepodařilo izolovat.

K této sérii syntéz je třeba zmínit, že kyselina 2,2,2-trifluorethylfosfinová byla ve všech baňkách z jedné syntézy, prošla tedy stejným postupem čištění pro všechny 4 reakční směsi série. Vznik nechtěného produktu se čpavkem ovšem byl pozorován pouze ve směsích obsahujících TFA. V reakcích v 3M HCl a 6M HCl vznik tohoto produktu pozorován nebyl vůbec a byl izolován ligand DOTP^{tfē}. Ovšem čpavek musely zákonitě obsahovat všechny reakční směsi. Navíc do reakcí obsahujících TFA bylo přidáno více cyklenu na základě postupného úbytku ³¹P NMR signálu odpovídající P–H vazbě za vzniku symetrického produktu. Poměr makrocyklus-čpavek byl tedy ve směsích s TFA rozhodně ve prospěch makrocyklu, přitom čpavek dle izolovaných produktů byl lepším reaktantem a konkuroval cyklenu. Oproti tomu ve směsích reagujících v HCl bylo makrocyklu podstatně méně, ale cyklen reagoval přednostně a to až do čtvrtého stupně.

Přítomnost čpavku v roztoku látky **3** i přes přečištění přes silný kationtový iontoměnič je vysvětlena tím, že kyselina 2,2,2-trifluorethylfosfinová je velmi silnou kyselinou a konkuruje kyselým skupinám navázaných na polymer v kationtovém iontoměniči. Během chromatografie tedy dochází k rovnováze a určité množství NH₄⁺ může zůstat v chromatografované směsi.[42]

K prozkoumání reaktivity čpavku s připravenou fosfinovou kyselinou v různých prostředích byl navržen experiment se sérií souběžných reakcí, kdy by reakční směsi obsahovaly definovaný poměr čpavek-makrocyklus, příp. pouze čpavek, za různých reakčních podmínek (přičemž jedním z kritérií by byla volba kyseliny, ve kterém by bylo reagováno). Tento experiment nebyl z časových důvodů proveden.

Elementární analýza

Provedená elementární analýza ukazuje vyšší obsah dusíku než odpovídá předpokládanému vzorci. Následná ¹H NMR analýza prokázala znečištění triethylaminem (TEA). Protože ligand byl triturován z organických rozpouštědel, byly příslušné ethylové signály v ¹H NMR spektru původně vyhodnoceny jako signály EtOH (s TEA nebylo při přípravě ligandu pracováno). Znečištění TEA bylo prokázáno ¹H NMR experimenty s konstantním přídavkem. Integrací NMR spekter bylo zjištěno, že původní vzorek zaslaný na elementární analýzu obsahuje cca 0,8 ekv. TEA. Přítomnost triethylaminu je možné vysvětlit extrémní kyselostí připraveného ligandu; může se jednat o nečistotu pocházející např. z RVO či iontoměniče.

Výsledek analýzy ukazuje ale silné znečištění chloridy, pravděpodobně chloridem sodným. Znečištění sodnými, příp. draselnými, kationty je možné vysvětlit silnou kyselostí ligandu, kdy dochází během odpařování naleptávání stěn baněk. Již bylo při přípravě trifluorethylfosfinové kyseliny (**3**) pozorováno, že i přes chromatografii na silném kationtovém iontoměniči je vodou eluována nejen látka **3**, ale také amoniak, který pravděpodobně vytéká z iontoměniče vodou jako iontový pár s látkou **3**. Je pravděpodobné, že jako iontový pár může být při chromatografii eluován vodou také iontový pár ligandu s aminy (TEA, DIPEA).

4.3 Příprava DO3P^{tfe}

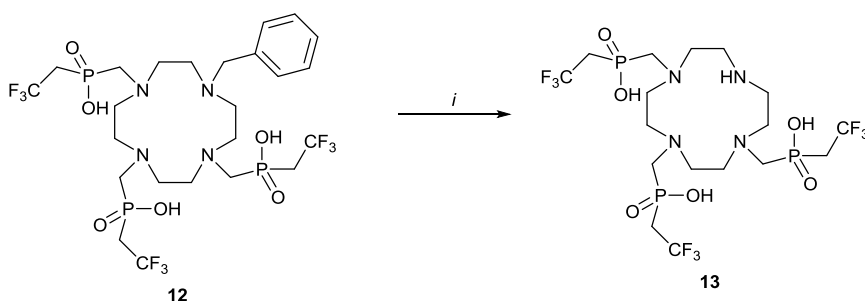


Schéma 4.5: Příprava DO3P^{tfe}

Tabulka 4.4: Reakční podmínky přípravy DO3P^{tfe}

| Metoda | <i>i</i> |
|--------|--|
| A | Pd/C, H ₂ ; H ₂ O |
| B | Pd/C, HCOO(NH ₄); MeOH |
| C | Pd/C, H ₂ ; 50% AcOH |
| D | CCl ₃ CH ₂ OCOCl; MeCN (dry) |
| E | Pd/C, proud H ₂ ; H ₂ O |

Bylo vyzkoušeno celkem 5 postupů přípravy této látky. Hydrogenace za atmosférického tlaku ve vodíkové atmosféře neprobíhá, stejně tak neprobíhá ani transhydrogenace mravenčanem amonným.

Dále byl vyzkoušen postup, při kterém by benzylová skupina byla nahrazena za 2,2,2-trichlorethylkarbamátovou skupinu, která by byla v dalším kroku hydrolyticky

odštěpena.[43] Ani tento postup nebyl úspěšný, nahrazení benzylové skupiny 2,2,2-trichlorethylkarbamátovou skupinou neprobíhá.

Postup hydrogenace ve vodě v mírném proudu vodíku vedl k 50% konverzi (zjištěno integrací signálů v ^1H NMR spektru; integrovány byly signály vodíků vázaných na cyklus ku signálu CH_2 skupiny benzylového pendantu). Přítomnost produktu **13** také byla potvrzena hmotností spektroskopií a TLC. Optimalizací tohoto postupu, např. změna koncentrace, množství katalyzátoru, změna rozpouštědla (plynný vodík je více rozpustný v kyselině octové oproti vodě), by mohla vést ke 100% konverzi a přípravě produktu **13**.

Tento produkt by následně mohl posloužit jako výchozí látka pro další ^{19}F MRI kontrastní látku, pokud by se na poslední dusík navázala obdobně velká skupina, jako je trifluorethylfosfinátová. Příslušné Ln^{III} komplexy by totiž měly poté poskytovat jeden symetrický izomer, což by vedlo k podobnosti chemického posunu všech CF_3 skupin.

Navíc možnost přidání jiné pendantní skupiny dává prostor pro navázání targetující skupiny, která by v těle interagovala pouze s vybranými strukturami.

4.4 Příprava 1,8-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]cyklamu

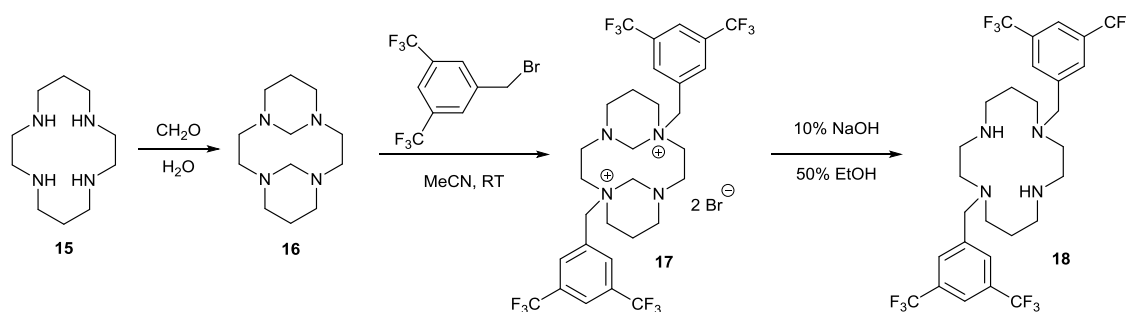


Schéma 4.6: Příprava 1,8-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]cyklamu

Příprava 1,8-regioizomerů cyklamu patří obecně k dobře zvládnutým syntézám a většina disubstituovaných derivátů je dostupná právě s touto konfigurací.[44] Jeden ze způsobů příprav vede přes cyklam chráněný bisaminalovým můstkem, který byl zvolen i při přípravě látky **18** dle lit.[37]. Následně byl chráněný cyklam alkylován dvěma ekvivalenty alkylačního činidla, v tomto případě bis(3,5-trifluormethyl)benzylbromidu. Z nábojových a sterických důvodů je biskvarterizace umožněna pouze do poloh 1,8. Následné odštěpení chránicí skupiny makrocyclu bylo provedeno bazicky

10% NaOH v 50% EtOH. Důvodem zvolení ethanolickeho roztoku byla špatná rozpustnost biskvartérní soli ve vodném roztoku hydroxidu.

4.5 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfinové) kyseliny

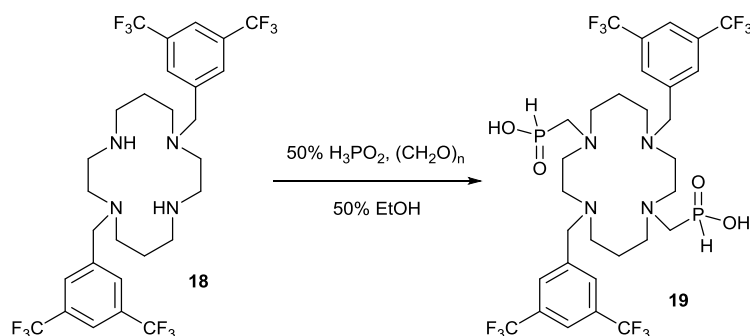


Schéma 4.7: Příprava látky **19**

Látka **19** byla připravena Mannichovou reakcí s kyselinou fosforovou a paraformaldehydem v 50% ethanolu. Přechištění produktu bylo provedeno přes silný kationtový iontoměnič a následnou elucí 10% pyridinem a 50% MeOH. Eluce 50% MeOH byla zvolena z důvodu velmi špatné rozpustnosti produktu ve vodě a velmi dobré rozpustnosti v methanolu. Produkt byl také z methanolu vykrystalován; produkt byl charakterizován také RTG krystalovou analýzou (viz kap. 3.3.8).

4.6 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis[methyl(hydroxomethyl)fosfinové] kyseliny

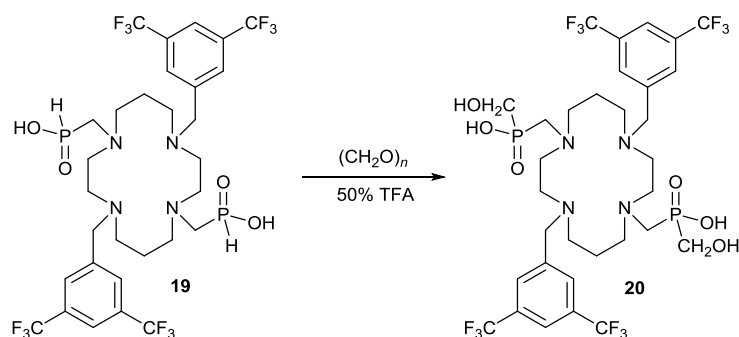


Schéma 4.8: Příprava látky **20**

Kvůli špatné rozpustnosti připravených ligandů ve vodě bylo zvoleno zavedení hydroxomethylové skupiny, která by měla rozpustnost ve vodě zlepšit. Ligand byl připraven hydroxomethylací paraformaldehydem v 50% TFA při 80 °C. Bylo zjištěno, že reakce při nižší teplotě neprobíhá.

4.7 Příprava tetraethylesteru 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

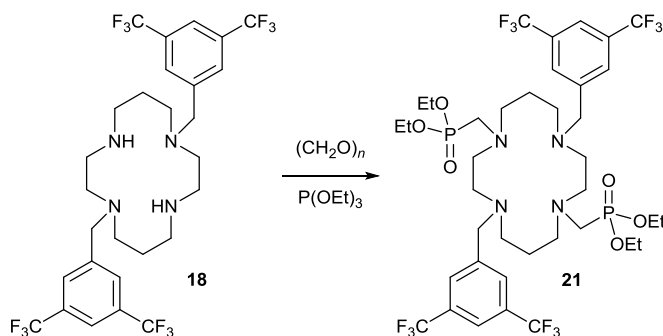
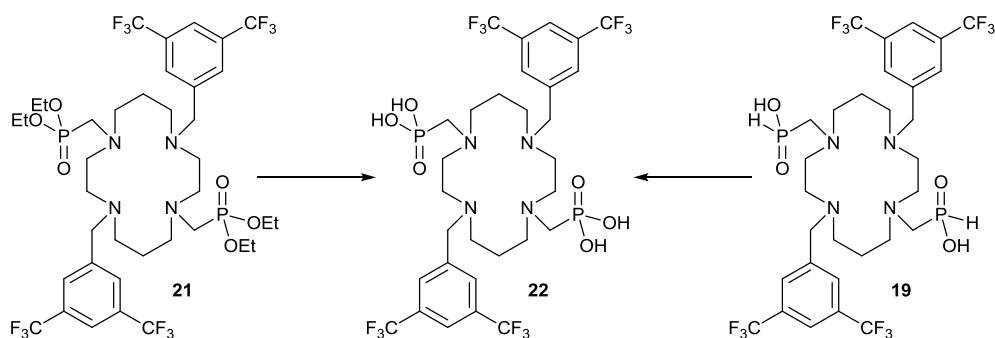


Schéma 4.9: Příprava látky **21**

Tetraethylester **21** byl připraven Mannichovou reakcí látky **18** s triethylfosfitem a paraformaldehydem; triethylfosfit zároveň sloužil jako rozpouštědlo. Výsledný produkt byl přečištěn přes silný kationtový iontoměnič a následnou sloupcovou chromatografií. Výtěžek reakce byl 78 %. Tento produkt byl také charakterizován pomocí RTG krystalové analýzy (viz kap 3.3.10).

Nepřesnosti v elementární analýze mohou být způsobeny chybou měření ve stanovení obsahu fosforu a fluoru. Analýza odpovídá, že kromě produktu analyt obsahoval cca jeden ekvivalent 3,5-bis(trifluormethyl)benzylové, ovšem ^1H NMR spektrum měřené při 600 MHz toto znečištění vyloučila. Integrace ^1H NMR dokázala, že poměr cyklus a aromatického jádra je 1:2, což odpovídá pouze přítomnosti látky **21**.

4.8 Příprava 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-4,11-bis[bis(3,5-trifluormethyl)benzyl]-1,8-bis(methylfosfonové) kyseliny

Schéma 4.10: Příprava látky **22**

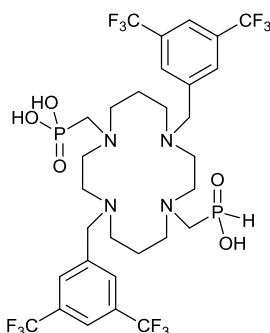
Původní návrh přípravy této methylfosfonové kyseliny bylo hydrolyzou jejího tetraethylesteru **21**. Byly vyzkoušeny 3 metody odstranění esterových skupin. První metoda byla přes nahrazení ethylesteru za trimethylsilylester pomocí TMSBr a následnou hydrolyzu k získání látky **22**. Tato metoda byla vyzkoušena třikrát; ani jednou nevedla ke kýženému produktu. Opakování postupu bylo z důvodu vyloučení špatně skladovaných chemikálií (suchý MeCN, TMSBr), ovšem ani použití komerčního suchého MeCN a zcela nového TMSBr nebylo úspěšné; první krok reakce (výměna ethylu za trimethylsilyl) nebyl úspěšný.

Druhý postup byl přes bazickou hydrolyzu pomocí nasyceného ethanického roztoku LiOH. Ani zde nebyl pozorován vznik produktu **22**.

Třetí postup byl přes kyselou hydrolyzu 6M HCl při zvýšené teplotě. Zde byla pozorována částečná hydrolyza – v MS spektrech se objevil signály o $m/z = 840,9$ (odpovídá diethylesteru) a $m/z = 953,0$ (odpovídá tetraethylesteru – $[M-Et]^-$, příp. triethylesteru – $[M-H]^-$). V ^{31}P NMR spektrech byly 2 signály, přičemž jeden odpovídal původní látce. Z naměřených dat lze usoudit, že došlo pouze k částečné hydrolyze, pravděpodobně ke vzniku diethylesteru a triethylesteru látky **22**.

Proto byl navržen postup, kdy je nejdříve připravena příslušná methylfosfinová kyselina (látky **19**), která bude v dalším kroku oxidována na kyselinu methylfosfonovou (látky **22**). Postup oxidace látky **19** byl zvolen dle lit.[45]. Jedná se o oxidaci pomocí chloridu rtuťnatého, ten se redukuje na chlorid rtuťný. Přebytky rtuťných a rtuťnatých kationtů byly odstraněny srážením zaváděním plynného H_2S do roztoku produktu. Původní syntéza byla provedena v 60% TFA kvůli rozpustnosti látky **19**, srážení sirovodíkem bylo prováděno ve vodě, ovšem z této směsi nebyl izolován žádný

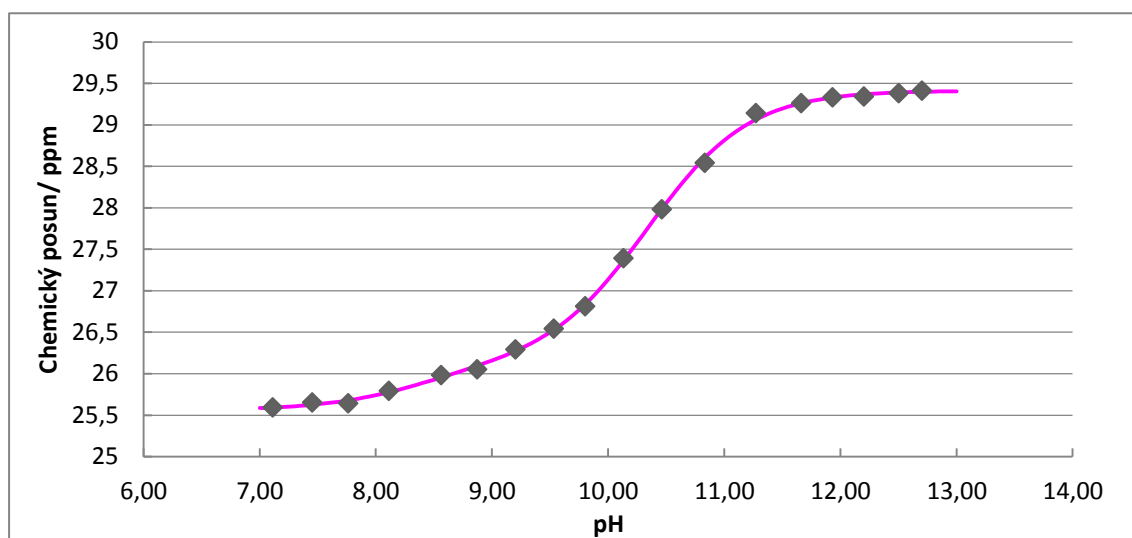
výsledný produkt, i když jeho signál byl nalezen v MS spektrech. Možným vysvětlením by mohla být sorpce produktu **22** na sraženinu HgS. Proto při druhém pokusu o přípravu látky **22** oxidací látky **19** bylo srážení sulfanem prováděno ve směsi isopropanolu a acetonu 1:1, ve které byla látka **22** rozpustná. Naneštěstí došlo ke zreagování rozpouštědel se sirovodíkem za vzniku organických thiolů; pravděpodobně se jednalo o adici sirovodíku na dvojnou vazbu C=O v acetonu. Tyto organické thioly byly zlikvidovány destilací přes Savo[®]. Teprve poté byla odfiltrována sraženina vzniklých sulfidů rtuti. Zbýlý filtrát byl přečištěn chromatografií na silném kationtovém iontoměniči. Výsledný olej byl rozpustný pouze v silně bazickém prostředí (pH vyšší než 12). ¹H a ¹³C spektra tohoto roztoku ale dokazují, že produkt **22** nebyl připraven v čisté formě, ale pravděpodobně pouze ve směsi s dalšími látkami. Je možné, že získaný olej je směsí produktu **22** a látky, která by nesla jednu fosfinátovou a jednu fosfonátovou pendantní skupinu (zobrazeno na obr. 4.4). Přítomnost takové látky ovšem nebyla pozorována v MS spektrech, ani při TLC.



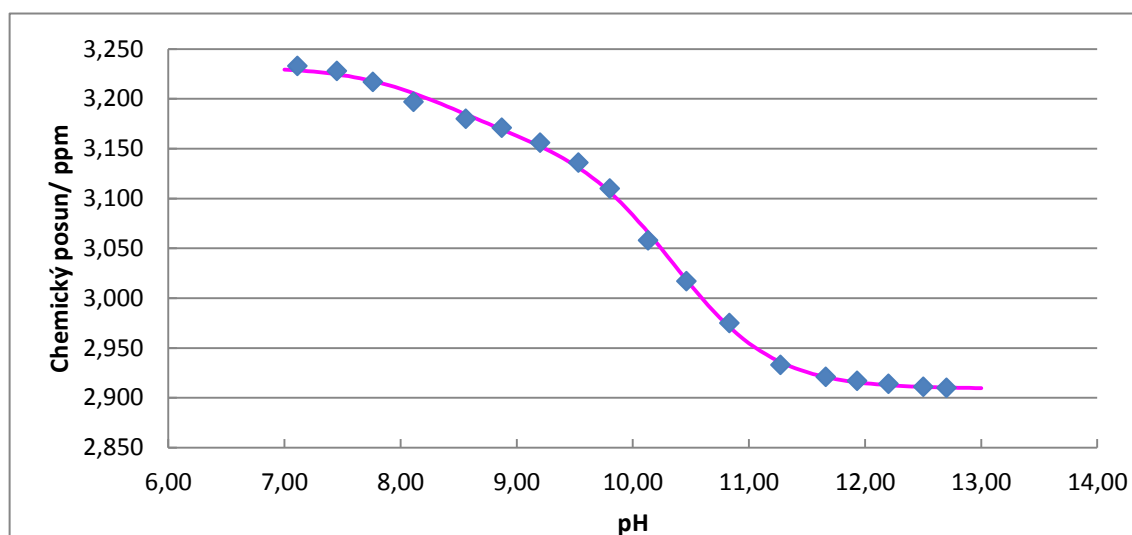
Obr. 4.4: Možný vedlejší produkt přípravy látky **22**

4.9 NMR titrace DOTP^{tfe}

Byla provedena NMR titrace ligandu DOTP^{tfe} v bazické oblasti (pH = 7–13) 5% roztokem CsOH v 20% D₂O. Vzorek byl připraven rozpuštěním 20 mg ligandu v 20% D₂O. Sledovány byly chemické posuny v ³¹P NMR a chemické posuny CH₂ skupin makrocyclu a CH₂ skupiny trifluorethylové skupiny. Průběhy titračních křivek jsou zobrazeny v grafech 4.1–2. Číselné hodnoty pH a chemických posunů jsou uvedeny v tabulce 4.5.



Graf 4.1: Závislost chemického posunu ³¹P NMR signálu DOTP^{tfe} na pH



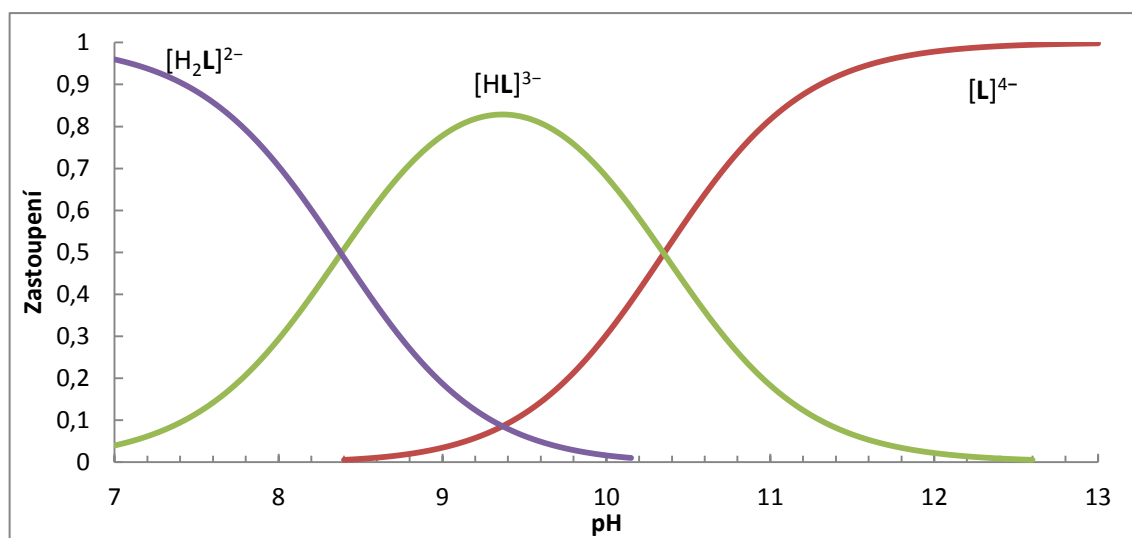
Graf 4.2: Závislost chemického posunu ¹H NMR signálu makrocyclu DOTP^{tfe} na pH

Tabulka 4.5: NMR titrace ligandu DOTP^{tfe} 5% roztokem CsOH v 20% D₂O

| pH | $\delta^{31}\text{P}$ NMR (121,4 MHz) | $\delta^1\text{H}$ NMR (299,9 MHz) | |
|-------|--|------------------------------------|--------|
| | | pendant | cyklus |
| 7,11 | 25,59 | 2,694 | 3,233 |
| 7,45 | 25,65 | 2,694 | 3,228 |
| 7,76 | 25,64 | 2,691 | 3,217 |
| 8,11 | 25,79 | 2,697 | 3,197 |
| 8,56 | 25,98 | 2,686 | 3,180 |
| 8,87 | 26,05 | 2,685 | 3,171 |
| 9,20 | 26,29 | 2,689 | 3,156 |
| 9,53 | 26,54 | 2,691 | 3,136 |
| 9,80 | 26,81 | 2,700 | 3,110 |
| 10,13 | 27,39 | 2,694 | 3,058 |
| 10,46 | 27,98 | 2,698 | 3,017 |
| 10,83 | 28,54 | 2,704 | 2,975 |
| 11,27 | 29,14 | 2,704 | 2,933 |
| 11,66 | 29,26 | 2,705 | 2,921 |
| 11,93 | 29,33 | 2,707 | 2,917 |
| 12,20 | 29,34 | 2,707 | 2,914 |
| 12,50 | 29,38 | 2,707 | 2,911 |
| 12,70 | 29,41 | 2,708 | 2,910 |

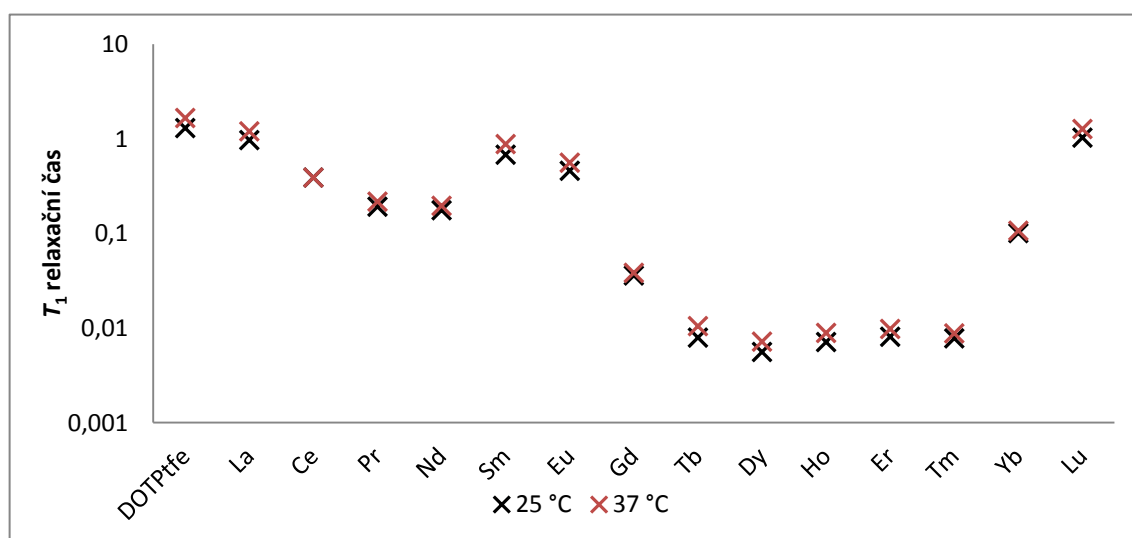
Z průběhu ^1H signálů makrocyklu a ^{31}P signálů ligandu DOTP^{tfe} byly programem OPIUM[46] spočítané hodnoty $\text{p}K_{\text{A}}([\text{H}_2\text{L}]^{2-}) = 8,38$ a $\text{p}K_{\text{A}}([\text{HL}]^{3-}) = 10,35$. Obě tyto deprotonizace odpovídají odštěpení protonu z dusíkových atomů makrocyklu a hodnoty disociačních konstant jsou poněkud nižší než je pro DOTA-like ligandy obvyklé.[26] Toto snížení je způsobeno elektron-odtahujícími vlastnostmi trifluorethylové skupiny. Vzhledem k minoritním změnám chemického posunu

vodíkových atomů trifluorethyllové skupiny bylo potvrzeno, že nedochází k její deprotonizaci. Ve spektrech nebyla pozorována ani změna multiplicity signálu, která by indikovala výměnu lehkého vodíku za deuterium v CH^- skupině. Nejedná se tedy o C-kyselinu. Také byl spočítán distribuční diagram různých protonizačních forem ligandu DOTP^{tfe} , zobrazeno v grafu 4.3.

Graf 4.3: Distribuční diagram ligandu DOTP^{tfe}

4.10 Relaxometrické studie komplexů $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$

Relaxační časy T_1 atomů ^{19}F ligandu DOTP^{tfe} a připravených komplexů $\text{Ln}(\text{dotp}^{\text{tfe}})$ byly změřeny v D_2O na spektrometru VNMR300 při teplotě 25 °C a 37 °C (graf 4.4 a tabulka 4.6)

Graf 4.4: T_1 relaxační časy ^{19}F DOTP^{tfe} a komplexů $[\text{Ln}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (uvedeno v logaritmické škále)

Tabulka 4.6: Relaxační časy T_1 ligandu DOTP^{tfe} a komplexů $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (282,2 MHz, D₂O)

| Látka | T_1 relaxační čas ^{19}F při 25 °C [s] | T_1 relaxační čas ^{19}F při 37 °C [s] | Magnetický moment Ln^{III} [47] |
|--|--|--|--|
| DOTP ^{tfe} | 1,30(3) | 1,66(2) | – |
| $[\text{La}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,97(4) | 1,20(5) | 0,0 |
| $[\text{Ce}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,39(10) | 0,39(2) | 2,5 |
| $[\text{Pr}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,192(6) | 0,217(10) | 3,5 |
| $[\text{Nd}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,176(6) | 0,196(5) | 3,6 |
| $[\text{Sm}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,68(3) | 0,88(3) | 1,5 |
| $[\text{Eu}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,46(2) | 0,56(2) | 3,4 |
| $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,0360(10) | 0,0384(10) | 8,0 |
| $[\text{Tb}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,00794(10) | 0,0105(2) | 9,3 |
| $[\text{Dy}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,0056(2) | 0,0072(2) | 10,6 |
| $[\text{Ho}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,00713(10) | 0,0089(2) | 10,4 |
| $[\text{Er}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,00811(10) | 0,0098(2) | 9,5 |
| $[\text{Tm}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,0078(2) | 0,0088(2) | 7,4 |
| $[\text{Yb}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 0,101(3) | 0,107(4) | 4,5 |
| $[\text{Lu}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 1,03(4) | 1,27(3) | 0,0 |

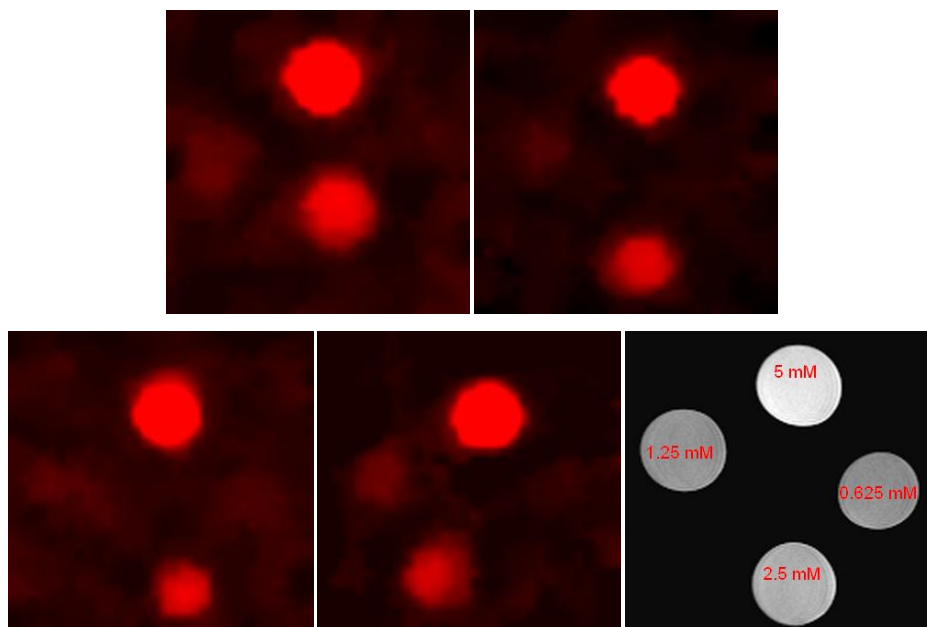
Z grafu 4.4 lze vysledovat, že v závislosti na velikosti magnetického momentu iontu lanthanoidu dochází ke snížení T_1 relaxačního času až o 3 řády.

Komplexy Ce^{III} , Dy^{III} , Ho^{III} , Tm^{III} a Yb^{III} byly také studovány na MRI spektrometru Bruker 4,7T (odpovídá rezonanční frekvenci 200 MHz pro ^1H a 188 MHz pro ^{19}F), kterým disponuje pracoviště IKEM.[48] Pomocí dostupných sekvencí byly naměřeny relaxační časy T_1 , T_2 a T_2^* , naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.6. Komplexy Ce^{III} a Yb^{III} byly měřeny sekvencí turbospinového echa (TE = 8,63 ms, TR = 500 ms pro Ce^{III} , 200 ms pro Yb^{III}). Komplexy Dy^{III} , Ho^{III} a Tm^{III} byly měřeny sekvencí gradientového echa (TE = 3,19 ms, TR = 15 ms).

Tabulka 4.6: Relaxační časy vybraných komplexů měřených na MRI spektrometru (188 MHz, 25 °C, H₂) [49]

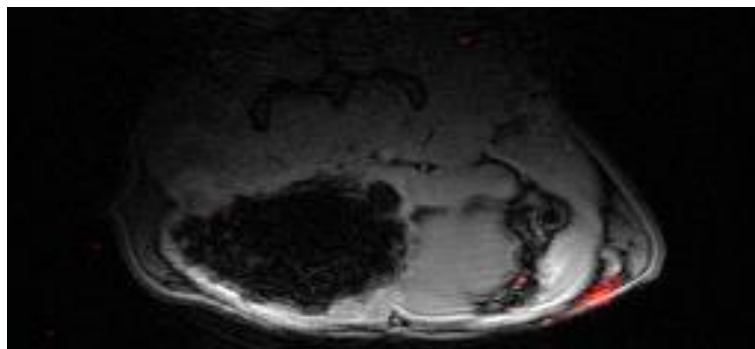
| | T_1 [ms] | T_2 [ms] | T_2^* [ms] |
|--|------------|------------|--------------|
| $[\text{Ce}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 234,8 | 84,5 | 4,28 |
| $[\text{Dy}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 10,9 | 5,7 | 5,45 |
| $[\text{Ho}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 10,9 | 7,3 | 4,08 |
| $[\text{Tm}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 10,8 | 9,1 | 5,12 |
| $[\text{Yb}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ | 106,9 | 73,9 | 4,36 |

Na základě zmíněných experimentů byly optimalizovány měřicí sekvence spinového a gradientového echa. Na obrázcích 4.5 jsou zobrazeny ^{19}F MRI snímky fantomů komplexů Ce^{III} , Dy^{III} , Tm^{III} a Yb^{III} ; na obr. 4.5 je také zobrazen ^1H MRI snímek komplexu Dy^{III} s označením koncentrací komplexu v měřeném roztoku. [36][48][49]

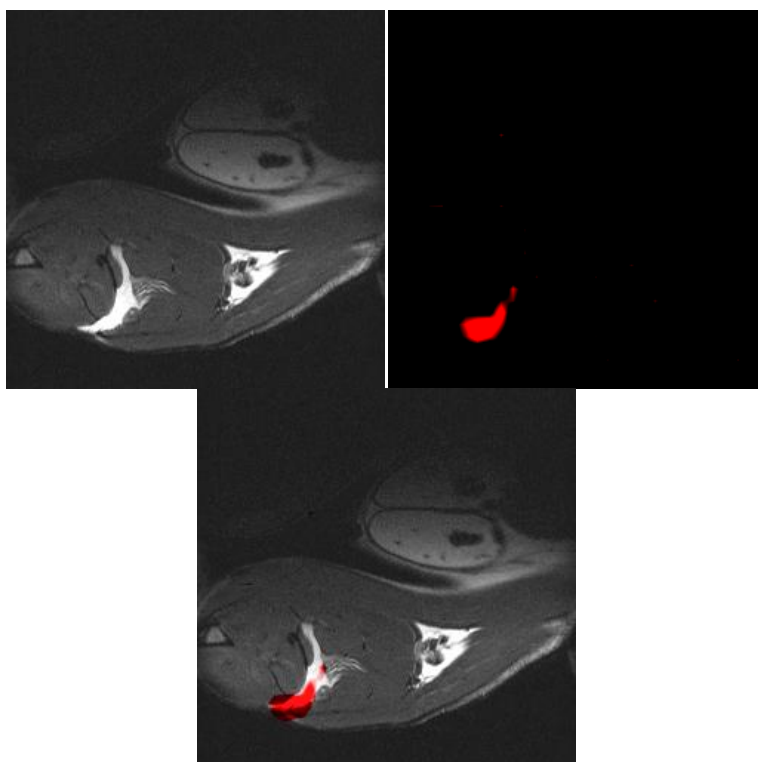


Obr. 4.5: ^{19}F MRI snímky fantomů roztoku komplexu $[\text{Ce}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (vlevo nahoře), roztoku $[\text{Dy}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (vpravo nahoře), roztoku $[\text{Tm}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (vlevo dole) a roztoku $[\text{Yb}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (dole uprostřed); ^1H MRI snímek roztoku $[\text{Dy}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ (vpravo dole); interpolované snímky matice 32×32 , velikost voxelu $1,5 \times 1,5 \times 2 \text{ mm}^3$. [36][46][47]

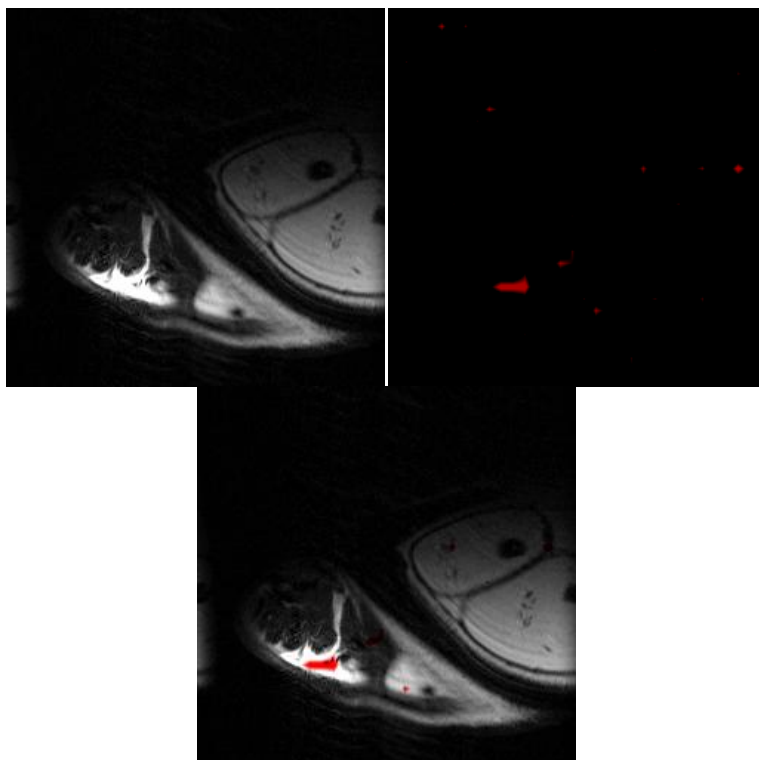
Získané znalosti a zkušenosti byly následně využity k prvním *in vivo* testům na potkanech. Obrázky 4.6–7 ukazují aplikaci komplexu $[\text{Yb}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ podkožně do oblasti břicha a aplikaci do svalu v koncentraci 7,1 mM (odpovídá koncentraci ^{19}F 85,2 mM). Dále byl intramuskulárně aplikován komplex $[\text{Ce}^{\text{III}}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$ v koncentraci 2,7 mM (odpovídá koncentraci ^{19}F 32,4 mM), viz obr. 4.8.



Obr. 4.6: MRI snímky břišní dutiny potkana po aplikaci komplexu $[\text{Yb}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$; překryv ^1H (černobíle) a ^{19}F MRI (červeně) snímků (sekvence turbospinového echa: TE = 8 ms; TR = 500 ms; aplikace 0,5 mL 7,1 mM roztoku $[\text{Yb}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$, celkový čas měření 17 min)



Obr. 4.7: MRI snímky lýtkového svalu potkana po aplikaci komplexu $[\text{Yb}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$; ^1H MRI snímek (vlevo nahoře), ^{19}F MRI snímek (vpravo nahoře); překryv snímků (dole): sekvence turbospinového echa: TE = 8 ms; TR = 500 ms; aplikace 0,5 mL 7,1 mM roztoku $[\text{Yb}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$, celkový čas měření 17 min)



Obr. 4.8: MRI snímky lýtkového svalu potkana po aplikaci komplexu $[\text{Ce}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$; ^1H MRI snímek (vlevo nahoře), ^{19}F MRI snímek (vpravo nahoře); překryv snímků (dole); sekvence turbospinového echa: TE = 8 ms; TR = 500 ms; aplikace 0,5 mL 2,7 mM roztoku $[\text{Ce}(\text{dotp}^{\text{tfe}})]^-$, celkový čas měření 50 min)

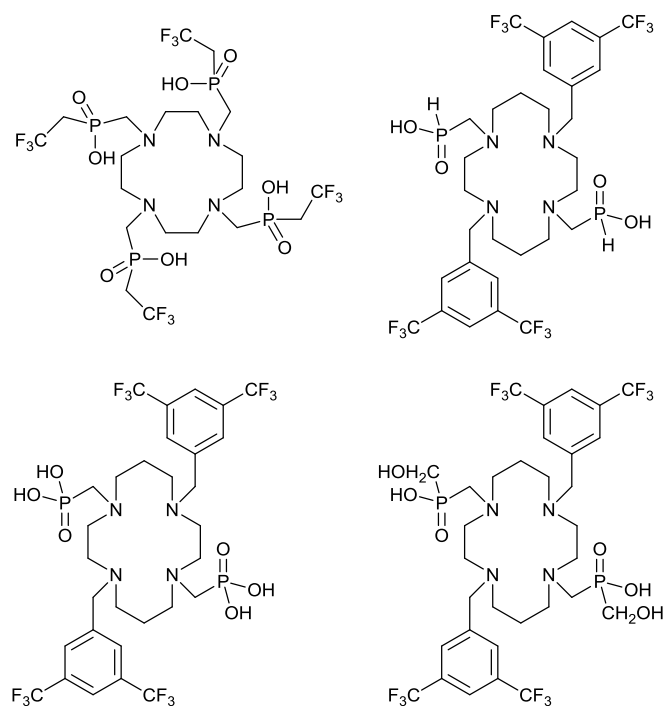
Prozatímni *in vivo* experimenty ukazují, že studované komplexy mohou být aplikovatelné jako kontrastní látky pro zobrazení krevního řečiště, stejně tak pro značení buněk.

5. Závěr

V rámci této diplomové práce byly připraveny a charakterizovány 4 navržené ligandy.

Příprava ligandu DOTP^{tfe} byla optimalizována a vybrané komplexy [Ln^{III}(dotp^{tfe})]⁻ byly studovány na MRI spektrometru na pracovišti IKEM. *In vitro* experimenty vedly k optimalizaci měřících sekvencí a možnosti přistoupit k *in vivo* testům.

Také byla provedena NMR titrace ligandu DOTP^{tfe} v bazické oblasti pro stanovení protonizačních konstant.



Obr. 5.1: Připravené ligandy s potenciálním využitím pro ¹⁹F MRI

6. Seznam literatury

- [1] M. Lecchi, L. Ottobrini, C. Martelli, A. Del Sol, and G. Lucignani, "Instrumentation and Probes for Molecular and Cellular Imaging," *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, no. 51, pp. 111–126, 2007.
- [2] G. D. Luker and K. E. Luker, "Optical Imaging: Current Applications and Future Directions," *J. Nucl. Med.*, no. 49, pp. 1–4, 2008.
- [3] C. J. Anderson and M. J. Welch, "Radiometal-Labeled Agents (Non-Techetium) for Diagnostic Imaging," *Chem. Rev.*, vol. 99, pp. 2219–2234, 1999.
- [4] J. Kotek and I. Lukeš, "Cheláty pro Využití v Biomedicínských Oborech," *Chem. List.*, vol. 104, pp. 1163–1174, 2010.
- [5] V. Ullmann, "Jaderná fyzika, Ionizující záření, Radiologie." [Online]. Available: <http://www.astronuklfyzika.cz/>.
- [6] J. Barbet, J.-F. Chatal, F. Gauché, and J. Marino, "Which Radionuclides Will Nuclear Oncology Need Tomorrow?," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, no. 33, pp. 627–630, 2006.
- [7] "OECD Health Statistics 2015 - Frequently Requested Data." [Online]. Available: <http://www.oecd.org/els/health-systems/>. [Accessed: 17-Jul-2015].
- [8] and L. M. L. M. V. H. Steven De Decker, Ingrid M. V. L. Gielen, Luc Duchateau, Johann Lang, Ruth Dennis, Nuria Corzo-Menéndez, Henri J. J. van Bree, Iris Van Soens, Dominique H. A. R. Binst, Tim Waelbers, "Intraobserver and interobserver agreement for results of low-field magnetic resonance imaging in dogs with and without clinical signs of disk-associated wobbler syndrome," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 238, pp. 74–80, 2011.
- [9] A. E. Merbach and É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

- [10] M. T. Vlaardingerbroek and J. A. den Boer, *Magnetic Resonance Imaging. Theory and Practice*. Verlag: Springer, 1996.
- [11] M. F. Reiser, W. Semmler, and H. Hricak, *Magnetic Resonance Tomography*, 4. vydání. Springer Science & Business Media, 2008.
- [12] I. Tirotta, V. Dichiarante, C. Pigliacelli, G. Cavallo, G. Terraneo, F. B. Bombelli, P. Metrangolo, and G. Resnati, "F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 2, pp. 1106–1129, 2015.
- [13] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, and R. B. Lauffer, "Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications," *Chem. Rev.*, vol. 99, pp. 2293–2352, 1999.
- [14] J. C. Knight, P. G. Edwards, and S. J. Paisey, "Fluorinated Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging; a Review of Recent Developments," *RSC Adv.*, vol. 1, no. 8, pp. 1415–1425, 2011.
- [15] J. Yu, V. D. Kodibagkar, W. Cui, and R. P. Mason, "19F: a Versatile Reporter for Non-invasive Physiology and Pharmacology Using Magnetic Resonance.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 819–848, Jan. 2005.
- [16] S. Mizukami, K. Tonai, M. Kaneko, and K. Kikuchi, "Lanthanide-based Protease Activity Sensors for Time-resolved Fluorescence Measurements," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 44, pp. 14376–14377, Nov. 2008.
- [17] S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, and K. Kikuchi, "Dual-function Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and 19F MRI.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 48, no. 20, pp. 3641–3643, Jan. 2009.
- [18] M. Higuchi, N. Iwata, Y. Matsuba, K. Sato, K. Sasamoto, and T. C. Saido, "19F and 1H MRI Detection of Amyloid Beta Plaques in Vivo.," *Nat. Neurosci.*, vol. 8, no. 4, pp. 527–533, Apr. 2005.
- [19] J. Blahut, "Regiospecifické deriváty cyklamu pro radiomedicínské a MRI aplikace," Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 2013.
- [20] H. Peng, I. Blakey, B. Dargaville, F. Rasoul, S. Rose, and A. K. Whittaker, "Synthesis and Evaluation of Partly Fluorinated Block Copolymers as MRI Imaging Agents," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 2, pp. 374–381, Feb. 2009.
- [21] K. H. Chalmers, E. De Luca, N. H. M. Hogg, A. M. Kenwright, I. Kuprov, D. Parker, M. Botta, J. I. Wilson, and A. M. Blamire, "Design Principles and Theory of Paramagnetic Fluorine-labelled Lanthanide Complexes as Probes for (19)F Magnetic Resonance: a Proof-of-concept Study.," *Chem. A Eur. J.*, vol. 16, no. 1, pp. 134–148, Jan. 2010.

- [22] P. I. R. Muraro, A. G. O. de Freitas, S. G. Trindade, F. C. Giacomelli, J.-J. Bonvent, V. Schmidt, F. P. dos Santos, and C. Giacomelli, "Easy access to ^{19}F -labeled nanoparticles for use as MRI contrast probes via self-assembly of fluorinated copolymers synthesized by sequential RAFT polymerization," *J. Fluor. Chem.*, vol. 168, pp. 251–259, 2014.
- [23] Z. Huang, R. S. Sengar, A. Nigam, M.-C. Abadjian, D. M. Potter, D. B. Grotjahn, and E. C. Wiener, "A Fluorinated Dendrimer-based Nanotechnology Platform: New Contrast Agents for High Field Imaging," *Invest. Radiol.*, vol. 45, no. 10, pp. 641–654, 2010.
- [24] P. K. Senanayake, A. M. Kenwright, D. Parker, and S. K. van der Hoorn, "Responsive Fluorinated Lanthanide Probes for ^{19}F Magnetic Resonance Spectroscopy," *Chem. Commun.*, no. 28, pp. 2923–2925, 2007.
- [25] P. Harvey, I. Kuprov, and D. Parker, "Lanthanide Complexes as Paramagnetic Probes for ^{19}F Magnetic Resonance," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2012, no. 12, pp. 2015–2022, Apr. 2012.
- [26] A. E. Martell, R. M. Smith, and R. J. Motekaitis, "Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database." 2004.
- [27] E. T. Clarke and A. E. Martell, "Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 190, no. 1, pp. 37–46, 1991.
- [28] a. D. Sherry, J. Ren, J. Huskens, E. Brücher, É. Tóth, C. F. C. G. Geraldes, M. M. C. a. Castro, and W. P. Cacheris, "Characterization of Lanthanide(III) DOTP Complexes: Thermodynamics, Protonation, and Coordination to Alkali Metal Ions," *Inorg. Chem.*, vol. 35, no. 16, pp. 4604–4612, 1996.
- [29] M. F. Tweedle, "Physicochemical Properties of Gadoteridol and Other Magnetic Resonance Contrast Agents," *Invest. Radiol.*, vol. 27, no. Suppl. 1, pp. 2–6, 1992.
- [30] J. R. Griffiths, "Are cancer cells acidic?," *Br. J. Cancer*, vol. 64, no. 3, pp. 425–427, 1991.
- [31] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano, and M. Sisti, "[Gd-AAZTA]-: A new structural entry for an improved generation of MRI contrast agents," *Inorg. Chem.*, vol. 43, no. 24, pp. 7588–7590, 2004.
- [32] P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, A. Dupont, M. B. Damholt, J. G. Heaf, and H. S. Thomsen, "Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 9, pp. 2359–2362, 2006.
- [33] "Omniscan." [Online]. Available: <http://www.drugs.com/pro/omniscan.html>.

- [34] J. Kotek, "Diplomová práce," Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 1999.
- [35] D. M. Corsi, C. Platas-Iglesias, H. Van Bekkum, and J. a. Peters, "Determination of Paramagnetic Lanthanide(III) Concentrations from Bulk Magnetic Susceptibility Shifts in NMR Spectra," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 39, no. 11, pp. 723–726, Nov. 2001.
- [36] V. Herynek, M. Martinisková, A. Gálisová, J. Kotek, D. Jiráček, and M. Hájek, "A probe for systemic administration or cell detection using ^{19}F MRI imaging," *9th Annu. Meet. Eur. Soc. Mol. Imaging - ESMi, Antwerp, Belgie, June 4-6, 2014*.
- [37] M. Paúrová, "Bifunkční chelatanty dvoumocné mědi," Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [38] M. Martinisková, "Kontrastní látky pro ^{19}F tomografii magnetické rezonance," Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 2013.
- [39] A. D. Sherry and C. F. G. C. Geraldes, "Shift Reagents in NMR Spectroscopy," in *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences*, 1989, pp. 93–126.
- [40] Y. Belabassi, M. I. Antczak, J. Tellez, and J.-L. Montchamp, "Borane Complexes of the $\text{H}(3)\text{PO}(2)$ P(III) Tautomer: Useful Phosphinate Equivalents," *Tetrahedron*, vol. 64, no. 39, pp. 9181–9190, Sep. 2008.
- [41] P. Hermann, "Ústní sdělení." .
- [42] J. Kotek, "Ústní sdělení." .
- [43] P. G. M. Wuts and T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edi. John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [44] J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, J. Rohovec, and I. Lukeš, "Crystal Structures and Reactivity of 3a,5a,8a,10a-Tetraazaperhydropyrene Derivatives. An Alternative Approach to Selective Nitrogen Alkylation of 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane (Cyclam)," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 65, no. 2, pp. 243–266, 2000.
- [45] J. Havlík, "Desing a syntéza selektivních chelatantů dvojmocné mědi," Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [46] M. Kývala and I. Lukeš, "OPIUM." 1995.
- [47] S. F. A. Kettle, *Physical Inorganic chemistry: A Coordination Chemistry Approach*. Spektrum, 1996.
- [48] V. Herynek, M. Martinisková, A. Gálisová, M. Jozefovičová, J. Kotek, D. Jiráček, and M. Hájek, "Influence of A Lanthanoid Ion on relaxation Times of ^{19}F contrast agent," in *No. 314, Magn. Reson. Mater. Phy 26(Suppl 1), 2013. 30th Annual Scientific Meeting ESMRMB, Toulouse, Oct 3-5, 2013*.

- [49] V. Herynek, M. Martinisková, A. Gálisová, J. Kotek, D. Jiráček, and M. Hájek, "Contrast agents with chelated lanthanide ions for ^{19}F MR imaging," *Joint Ann Meet. ISMRM-ESMRMB, Milano, May 10-16 2014*.

7. Seznam použitých zkratek

| | |
|---------------------|---|
| Bn | benzyl |
| CA | contrast agent (kontrastní látka) |
| CSA | chemical shift anisotropy (anizotropie chemického posunu) |
| CT | computed tomography (počítačová tomografie) |
| cyklam | 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan |
| cyklen | 1,4,7,10-tetraazacyklododekan |
| DCM | dichlormethan |
| DD | dipól-dipól |
| DIPEA | ethyldiisopropylamin |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina |
| DOTP | 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetramethylfosfonová kyselina |
| DOTP ^{tfe} | 1,4,7,10-tetraazacyklododeka-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluorethyl)fosfinová kyselina] |
| DTPA | 1,1,4,7,7-diethylentriaminpentaoctová kyselina |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| EtOAc | ethylacetát |
| EtOH | ethanol |
| FDG | 2-deoxy-2(¹⁸ F)fluor-D-glukóza |

| | |
|--------|---|
| HMDS | hexamethyldisilazan (bis(trimethylsilyl)amin) |
| LiHMDS | bis(trimethylsilyl)amid lithný |
| IPAV | <i>i</i> propanol/konc. aq. amoniak/voda (<i>i</i> PrOH/konc. aq. NH ₃ /H ₂ O) |
| MeCN | acetonitril |
| MeOH | methanol |
| MRI | magnetic resonance imaging (tomografie magnetické rezonance) |
| MS-ESI | mass spectroscopy - electrospray ionization |
| NMR | nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance) |
| NSF | nefrogenní systémová fibróza |
| PET | positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie) |
| R_f | retenční faktor |
| RT | room temperature (pokojová teplota) |
| RVO | rotační vakuová odparka |
| SPECT | single-photon emission tomography (jednofotonová emisní tomografie) |
| TEA | triethylamin |
| TFA | trifluoroctová kyselina |
| THF | tetrahydrofuran |
| TMS | tetramethylsilyl |
| TLC | thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie) |